(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-505678
(P2024-505678A)
(43)公表日　令和6年2月7日(2024.2.7)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/11 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/11	Ｚ	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10	ＺＮＡ	４Ｃ０７６
Ｃ１２Ｎ	*5/0783(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0783		４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ	*47/69 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/69		４Ｃ０８５
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		４Ｃ０８７

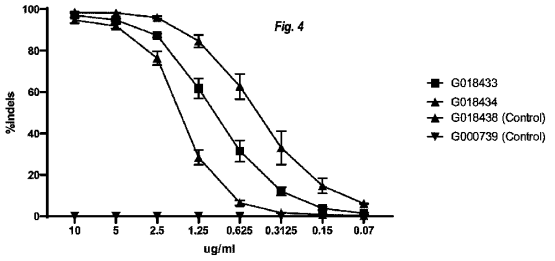
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全161頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-547397(P2023-547397)
(86)(22)出願日　令和4年2月7日(2022.2.7)
(85)翻訳文提出日　令和5年10月3日(2023.10.3)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/015498
(87)国際公開番号　WO2022/170194
(87)国際公開日　令和4年8月11日(2022.8.11)
(31)優先権主張番号　63/147,223
(32)優先日　令和3年2月8日(2021.2.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　518196169
インテリア セラピューティクス，イン
コーポレイテッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９，ケンブリッジ，エリー スト
リート ４０，スイート １３０
(74)代理人　100092783
弁理士　小林 浩
(74)代理人　100093676
弁理士　小林 純子
(74)代理人　100120134
弁理士　大森 規雄
(74)代理人　100186897
弁理士　平川 さやか
(72)発明者　コーク，ダニエル ライアン
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　免疫療法のためのリンパ球活性化遺伝子３（ＬＡＧ３）組成物及び方法

(57)【要約】
ＬＡＧ３遺伝子内で編集するための、例えば、ＤＮＡ配列を改変するための組成物及び方法が提供される。免疫療法のための組成物及び方法が提供される。
【選択図】図４



10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ｃｈｒ１２．６７７２４８３－６７７８４５５のゲノム座標内に、ヒトＬＡＧ３配列における遺伝子修飾を含む、操作された細胞。
【請求項２】
前記遺伝子修飾が、挿入、欠失、及び置換から選択される、請求項１に記載の操作された細胞。
【請求項３】
前記遺伝子修飾が、前記ＬＡＧ３遺伝子の発現を阻害する、請求項１または２に記載の操作された細胞。
【請求項４】
前記遺伝子修飾が、以下から選択されるゲノム座標：
【表１】

ＬＡＧ３番号	ゲノム座標　（ｈｇ３８）
ＬＡＧ３－１	ｃｈｒ１２：６７７３９３８－６７７３９５８
ＬＡＧ３－２	ｃｈｒ１２：６７７４６７８－６７７４６９８
ＬＡＧ３－３	ｃｈｒ１２：６７７２８９４－６７７２９１４
ＬＡＧ３－４	ｃｈｒ１２：６７７４８１６－６７７４８３６
ＬＡＧ３－５	ｃｈｒ１２：６７７４７４２－６７７４７６２
ＬＡＧ３－６	ｃｈｒ１２：６７７５３８０－６７７５４００
ＬＡＧ３－７	ｃｈｒ１２：６７７４７２７－６７７４７４７
ＬＡＧ３－８	ｃｈｒ１２：６７７４７３２－６７７４７５２
ＬＡＧ３－９	ｃｈｒ１２：６７７７４３５－６７７７４５５
ＬＡＧ３－１０	ｃｈｒ１２：６７７４７７１－６７７４７９１
ＬＡＧ３－１１	ｃｈｒ１２：６７７２９０９－６７７２９２９
ＬＡＧ３－１２	ｃｈｒ１２：６７７４７３５－６７７４７５５
ＬＡＧ３－１３	ｃｈｒ１２：６７７３７８３－６７７３８０３
ＬＡＧ３－１４	ｃｈｒ１２：６７７５２９２－６７７５３１２
ＬＡＧ３－１５	ｃｈｒ１２：６７７７４３３－６７７７４５３
ＬＡＧ３－１６	ｃｈｒ１２：６７７８２６８－６７７８２８８
ＬＡＧ３－１７	ｃｈｒ１２：６７７５４４４－６７７５４６４
ＬＡＧ３－２４	ｃｈｒ１２：６７７７７８３－６７７７８０３
ＬＡＧ３－２６	ｃｈｒ１２：６７７７７８４－６７７７８０４
ＬＡＧ３－４１	ｃｈｒ１２：６７７８２５２－６７７８２７２
ＬＡＧ３－５９	ｃｈｒ１２：６７７７３２５－６７７７３４５
ＬＡＧ３－８３	ｃｈｒ１２：６７７７３２９－６７７７３４９

または、ＬＡＧ３－１～ＬＡＧ３－１５：ｃｈｒ１２：６７７３９３８－６７７３９５８、ｃｈｒ１２：６７７４６７８－６７７４６９８、ｃｈｒ１２：６７７２８９４－６７７２９１４、ｃｈｒ１２：６７７４８１６－６７７４８３６、ｃｈｒ１２：６７７４７４２－６７７４７６２、ｃｈｒ１２：６７７５３８０－６７７５４００、ｃｈｒ１２：６７７４７２７－６７７４７４７、ｃｈｒ１２：６７７４７３２－６７７４７５２、ｃｈｒ１２：６７７７４３５－６７７７４５５、ｃｈｒ１２：６７７４７７１－６７７４７９１、ｃｈｒ１２：６７７２９０９－６７７２９２９、ｃｈｒ１２：６７７４７３５－６７７４７５５、ｃｈｒ１２：６７７３７８３－６７７３８０３、ｃｈｒ１２：６７７５２９２－

６７７５３１２、及び、ｃｈｒ１２：６７７７４３３－６７７７４５３によって標的とされるものから選択されるゲノム座標；または、
ＬＡＧ３－１～ＬＡＧ３－１１：ｃｈｒ１２：６７７３９３８－６７７３９５８、ｃｈｒ１２：６７７４６７８－６７７４６９８、ｃｈｒ１２：６７７２８９４－６７７２９１４、及びｃｈｒ１２：６７７４８１６－６７７４８３６、ｃｈｒ１２：６７７４７４２－６７７４７６２、ｃｈｒ１２：６７７５３８０－６７７５４００、ｃｈｒ１２：６７７４７２７－６７７４７４７、ｃｈｒ１２：６７７４７３２－６７７４７５２、ｃｈｒ１２：６７７７４３５－６７７７４５５、ｃｈｒ１２：６７７４７７１－６７７４７９１、及び、ｃｈｒ１２：６７７２９０９－６７７２９２９によって標的とされるものから選択されるゲノム座標；または、
ＬＡＧ３－１～ＬＡＧ３－４：ｃｈｒ１２：６７７３９３８－６７７３９５８、ｃｈｒ１２：６７７４６７８－６７７４６９８、ｃｈｒ１２：６７７２８９４－６７７２９１４、及び、ｃｈｒ１２：６７７４８１６－６７７４８３６によって標的とされるものから選択されるゲノム座標；または、
ＬＡＧ３－１、ＬＡＧ３－４、ＬＡＧ３－５、及びＬＡＧ３－９：ｃｈｒ１２：６７７３９３８－６７７３９５８、ｃｈｒ１２：６７７４８１６－６７７４８３６、ｃｈｒ１２：６７７４７４２－６７７４７６２、及びｃｈｒ１２：６７７７４３５－６７７７４５５によって標的とされるものから選択されるゲノム座標である、請求項１～３のいずれか１項に記載の操作された細胞。
【請求項５】
前記操作された細胞が、内因性Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）配列のゲノム座標内の遺伝子修飾を含み、前記遺伝子修飾が、ＴＣＲ遺伝子の発現を阻害し、任意選択で、前記ＴＣＲ遺伝子が、ＴＲＡＣまたはＴＲＢＣである、請求項１～４のいずれか１項に記載の操作された細胞。
【請求項６】
以下：

【表２－１】

ＴＲＢＣ番号：	ゲノム座標　（ｈｇ３８）
ＴＲＢＣ－１	ｃｈｒ７：１４２７９１９９６－１４２７９２０１６
ＴＲＢＣ－２	ｃｈｒ７：１４２７９２０４７－１４２７９２０６７
ＴＲＢＣ－３	ｃｈｒ７：１４２７９２００８－１４２７９２０２８
ＴＲＢＣ－４	ｃｈｒ７：１４２７９１９３１－１４２７９１９５１
ＴＲＢＣ－５	ｃｈｒ７：１４２７９１９３０－１４２７９１９５０
ＴＲＢＣ－６	ｃｈｒ７：１４２７９１７４８－１４２７９１７６８
ＴＲＢＣ－７	ｃｈｒ７：１４２７９１７２０－１４２７９１７４０
ＴＲＢＣ－８	ｃｈｒ７：１４２７９２０４１－１４２７９２０６１
ＴＲＢＣ－９	ｃｈｒ７：１４２８０２１１４－１４２８０２１３４
ＴＲＢＣ－１０	ｃｈｒ７：１４２７９２００９－１４２７９２０２９
ＴＲＢＣ－１１	ｃｈｒ７：１４２７９２６９７－１４２７９２７１７
ＴＲＢＣ－１２	ｃｈｒ７：１４２７９１９６３－１４２７９１９８３
ＴＲＢＣ－１３	ｃｈｒ７：１４２７９１９７６－１４２７９１９９６
ＴＲＢＣ－１４	ｃｈｒ７：１４２７９１９７４－１４２７９１９９４
ＴＲＢＣ－１５	ｃｈｒ７：１４２７９１９７０－１４２７９１９９０
ＴＲＢＣ－１６	ｃｈｒ７：１４２７９１９４８－１４２７９１９６８
ＴＲＢＣ－１７	ｃｈｒ７：１４２７９１９１３－１４２７９１９３３
ＴＲＢＣ－１８	ｃｈｒ７：１４２７９１９６１－１４２７９１９８１
ＴＲＢＣ－１９	ｃｈｒ７：１４２７９２０６８－１４２７９２０８８
ＴＲＢＣ－２０	ｃｈｒ７：１４２７９１９７５－１４２７９１９９５
ＴＲＢＣ－２１	ｃｈｒ７：１４２７９１７７３－１４２７９１７９３
ＴＲＢＣ－２２	ｃｈｒ７：１４２７９１９１９－１４２７９１９３９
ＴＲＢＣ－２３	ｃｈｒ７：１４２７９１８３４－１４２７９１８５４
ＴＲＢＣ－２４	ｃｈｒ７：１４２７９１８７８－１４２７９１８９８
ＴＲＢＣ－２５	ｃｈｒ７：１４２８０２１４１－１４２８０２１６１
ＴＲＢＣ－２６	ｃｈｒ７：１４２７９１８４４－１４２７９１８６４
ＴＲＢＣ－２７	ｃｈｒ７：１４２８０１１５４－１４２８０１１７４
ＴＲＢＣ－２８	ｃｈｒ７：１４２７９１９６１－１４２７９１９８１
ＴＲＢＣ－２９	ｃｈｒ７：１４２７９２００１－１４２７９２０２１
ＴＲＢＣ－３０	ｃｈｒ７：１４２７９１９７９－１４２７９１９９９
ＴＲＢＣ－３１	ｃｈｒ７：１４２７９２０４１－１４２７９２０６１
ＴＲＢＣ－３２	ｃｈｒ７：１４２７９２００３－１４２７９２０２３
ＴＲＢＣ－３３	ｃｈｒ７：１４２７９１９８４－１４２７９２００４
ＴＲＢＣ－３４	ｃｈｒ７：１４２７９２００２－１４２７９２０２２
ＴＲＢＣ－３５	ｃｈｒ７：１４２７９１９６６－１４２７９１９８６

【表２－２】

ＴＲＢＣ－３６	ｃｈｒ７：１４２７９２００７－１４２７９２０２７
ＴＲＢＣ－３７	ｃｈｒ７：１４２７９１９９３－１４２７９２０１３
ＴＲＢＣ－３８	ｃｈｒ７：１４２７９１９０２－１４２７９１９２２
ＴＲＢＣ－３９	ｃｈｒ７：１４２７９１７２４－１４２７９１７４４
ＴＲＢＣ－４０	ｃｈｒ７：１４２７９１９７３－１４２７９１９９３
ＴＲＢＣ－４１	ｃｈｒ７：１４２７９１９２０－１４２７９１９４０
ＴＲＢＣ－４２	ｃｈｒ７：１４２７９１９９４－１４２７９２０１４
ＴＲＢＣ－４３	ｃｈｒ７：１４２７９１８８７－１４２７９１９０７
ＴＲＢＣ－４４	ｃｈｒ７：１４２７９１９０７－１４２７９１９２７
ＴＲＢＣ－４５	ｃｈｒ７：１４２７９１９５２－１４２７９１９７２
ＴＲＢＣ－４６	ｃｈｒ７：１４２７９１７２１－１４２７９１７４１
ＴＲＢＣ－４７	ｃｈｒ７：１４２７９２７１８－１４２７９２７３８
ＴＲＢＣ－４８	ｃｈｒ７：１４２７９１７２９－１４２７９１７４９
ＴＲＢＣ－４９	ｃｈｒ７：１４２７９１９１１－１４２７９１９３１
ＴＲＢＣ－５０	ｃｈｒ７：１４２７９１８６７－１４２７９１８８７
ＴＲＢＣ－５１	ｃｈｒ７：１４２７９１８９９－１４２７９１９１９
ＴＲＢＣ－５２	ｃｈｒ７：１４２７９１７２７－１４２７９１７４７
ＴＲＢＣ－５３	ｃｈｒ７：１４２７９１９４９－１４２７９１９６９
ＴＲＢＣ－５４	ｃｈｒ７：１４２７９１９３３－１４２７９１９５３
ＴＲＢＣ－５５	ｃｈｒ７：１４２７９１９３２－１４２７９１９５２
ＴＲＢＣ－５６	ｃｈｒ７：１４２７９２０５７－１４２７９２０７７
ＴＲＢＣ－５７	ｃｈｒ７：１４２７９１９４０－１４２７９１９６０
ＴＲＢＣ－５８	ｃｈｒ７：１４２７９１７４７－１４２７９１７６７
ＴＲＢＣ－５９	ｃｈｒ７：１４２７９１８８１－１４２７９１９０１
ＴＲＢＣ－６０	ｃｈｒ７：１４２７９１７７９－１４２７９１７９９
ＴＲＢＣ－６１	ｃｈｒ７：１４２７９２０５４－１４２７９２０７４
ＴＲＢＣ－６２	ｃｈｒ７：１４２７９２０６９－１４２７９２０８９
ＴＲＢＣ－６３	ｃｈｒ７：１４２７９２７１２－１４２７９２７３２
ＴＲＢＣ－６４	ｃｈｒ７：１４２７９１７２９－１４２７９１７４９
ＴＲＢＣ－６５	ｃｈｒ７：１４２７９１８２１－１４２７９１８４１
ＴＲＢＣ－６６	ｃｈｒ７：１４２７９２０５２－１４２７９２０７２
ＴＲＢＣ－６７	ｃｈｒ７：１４２７９１９１６－１４２７９１９３６
ＴＲＢＣ－６８	ｃｈｒ７：１４２７９１８９９－１４２７９１９１９
ＴＲＢＣ－６９	ｃｈｒ７：１４２７９１７７２－１４２７９１７９２
ＴＲＢＣ－７０	ｃｈｒ７：１４２７９２７１４－１４２７９２７３４
ＴＲＢＣ－７１	ｃｈｒ７：１４２７９２０４２－１４２７９２０６２

【表２－３】

ＴＲＢＣ－７２	ｃｈｒ７：１４２７９１９６２－１４２７９１９８２
ＴＲＢＣ－７３	ｃｈｒ７：１４２７９１９８８－１４２７９２００８
ＴＲＢＣ－７４	ｃｈｒ７：１４２７９１９８２－１４２７９２００２
ＴＲＢＣ－７５	ｃｈｒ７：１４２７９２０４９－１４２７９２０６９
ＴＲＢＣ－７６	ｃｈｒ７：１４２７９１８３９－１４２７９１８５９
ＴＲＢＣ－７７	ｃｈｒ７：１４２７９１８９３－１４２７９１９１３
ＴＲＢＣ－７８	ｃｈｒ７：１４２７９１９４５－１４２７９１９６５
ＴＲＢＣ－７９	ｃｈｒ７：１４２７９１９６４－１４２７９１９８４
ＴＲＢＣ－８０	ｃｈｒ７：１４２７９１７５７－１４２７９１７７７
ＴＲＢＣ－８１	ｃｈｒ７：１４２７９２０４８－１４２７９２０６８
ＴＲＢＣ－８２	ｃｈｒ７：１４２７９１７７４－１４２７９１７９４
ＴＲＢＣ－８３	ｃｈｒ７：１４２７９２０４８－１４２７９２０６８
ＴＲＢＣ－８４	ｃｈｒ７：１４２７９１８３０－１４２７９１８５０
ＴＲＢＣ－８５	ｃｈｒ７：１４２７９１９０９－１４２７９１９２９
ＴＲＢＣ－８６	ｃｈｒ７：１４２７９１９１２－１４２７９１９３２
ＴＲＢＣ－８７	ｃｈｒ７：１４２７９１７６６－１４２７９１７８６
ＴＲＢＣ－８８	ｃｈｒ７：１４２７９１８８０－１４２７９１９００
ＴＲＢＣ－８９	ｃｈｒ７：１４２７９１９１９－１４２７９１９３９

から選択されるゲノム座標内にＴＲＢＣの遺伝子修飾を含む、請求項５に記載の操作された細胞。

【請求項７】

以下：

【表３－１】

ＴＲＡＣ番号：	ゲノム座標　（ｈｇ３８）
ＴＲＡＣ－９０	ｃｈｒ１４：２２５４７５２４－２２５４７５４４
ＴＲＡＣ－９１	ｃｈｒ１４：２２５５０５８１－２２５５０６０１
ＴＲＡＣ－９２	ｃｈｒ１４：２２５５０６０８－２２５５０６２８
ＴＲＡＣ－９３	ｃｈｒ１４：２２５５０６１１－２２５５０６３１
ＴＲＡＣ－９４	ｃｈｒ１４：２２５５０６２２－２２５５０６４２
ＴＲＡＣ－９５	ｃｈｒ１４：２２５４７５２９－２２５４７５４９
ＴＲＡＣ－９６	ｃｈｒ１４：２２５４７５１２－２２５４７５３２
ＴＲＡＣ－９７	ｃｈｒ１４：２２５４７５２５－２２５４７５４５
ＴＲＡＣ－９８	ｃｈｒ１４：２２５４７５３６－２２５４７５５６

【表３－２】

ＴＲＡＣ－９９	ｃｈｒ１４：２２５４７５７５－２２５４７５９５
ＴＲＡＣ－１００	ｃｈｒ１４：２２５４７６４０－２２５４７６６０
ＴＲＡＣ－１０１	ｃｈｒ１４：２２５４７６４７－２２５４７６６７
ＴＲＡＣ－１０２	ｃｈｒ１４：２２５４７７７７－２２５４７７９７
ＴＲＡＣ－１０３	ｃｈｒ１４：２２５４９６３８－２２５４９６５８
ＴＲＡＣ－１０４	ｃｈｒ１４：２２５４９６４６－２２５４９６６６
ＴＲＡＣ－１０５	ｃｈｒ１４：２２５５０６００－２２５５０６２０
ＴＲＡＣ－１０６	ｃｈｒ１４：２２５５０６０５－２２５５０６２５
ＴＲＡＣ－１０７	ｃｈｒ１４：２２５５０６２５－２２５５０６４５
ＴＲＡＣ－１０８	ｃｈｒ１４：２２５３９１１６－２２５３９１３６
ＴＲＡＣ－１０９	ｃｈｒ１４：２２５３９１２０－２２５３９１４０
ＴＲＡＣ－１１０	ｃｈｒ１４：２２５４７５１８－２２５４７５３８
ＴＲＡＣ－１１１	ｃｈｒ１４：２２５３９０８２－２２５３９１０２
ＴＲＡＣ－１１２	ｃｈｒ１４：２２５３９０６１－２２５３９０８１
ＴＲＡＣ－１１３	ｃｈｒ１４：２２５３９０９７－２２５３９１１７
ＴＲＡＣ－１１４	ｃｈｒ１４：２２５４７６９７－２２５４７７１７
ＴＲＡＣ－１１５	ｃｈｒ１４：２２５５０５７１－２２５５０５９１
ＴＲＡＣ－１１６	ｃｈｒ１４：２２５５０６３１－２２５５０６５１
ＴＲＡＣ－１１７	ｃｈｒ１４：２２５５０６５８－２２５５０６７８
ＴＲＡＣ－１１８	ｃｈｒ１４：２２５４７７１２－２２５４７７３２
ＴＲＡＣ－１１９	ｃｈｒ１４：２２５５０６３６－２２５５０６５６
ＴＲＡＣ－１２０	ｃｈｒ１４：２２５５０６３６－２２５５０６５６
ＴＲＡＣ－１２１	ｃｈｒ１４：２２５５０５８２－２２５５０６０２
ＴＲＡＣ－１２２	ｃｈｒ１４：２２５５０６０６－２２５５０６２６
ＴＲＡＣ－１２３	ｃｈｒ１４：２２５５０６０９－２２５５０６２９
ＴＲＡＣ－１２４	ｃｈｒ１４：２２５４７６９１－２２５４７７１１
ＴＲＡＣ－１２５	ｃｈｒ１４：２２５４７５７６－２２５４７５９６
ＴＲＡＣ－１２６	ｃｈｒ１４：２２５４９６４８－２２５４９６６８
ＴＲＡＣ－１２７	ｃｈｒ１４：２２５４９６６０－２２５４９６８０
ＴＲＡＣ－１２８	ｃｈｒ１４：２２５４７７１６－２２５４７７３６
ＴＲＡＣ－１２９	ｃｈｒ１４：２２５４７５１４－２２５４７５３４
ＴＲＡＣ－１３０	ｃｈｒ１４：２２５５０６６２－２２５５０６８２
ＴＲＡＣ－１３１	ｃｈｒ１４：２２５５０５９３－２２５５０６１３
ＴＲＡＣ－１３２	ｃｈｒ１４：２２５５０６１２－２２５５０６３２
ＴＲＡＣ－１３３	ｃｈｒ１４：２２５４７５２１－２２５４７５４１
ＴＲＡＣ－１３４	ｃｈｒ１４：２２５４７５４０－２２５４７５６０

【表３－３】

ＴＲＡＣ－１３５	ｃｈｒ１４：２２５３９１２１－２２５３９１４１
ＴＲＡＣ－１３６	ｃｈｒ１４：２２５４７６３２－２２５４７６５２
ＴＲＡＣ－１３７	ｃｈｒ１４：２２５４７６７４－２２５４７６９４
ＴＲＡＣ－１３８	ｃｈｒ１４：２２５４９６４３－２２５４９６６３
ＴＲＡＣ－１３９	ｃｈｒ１４：２２５４７６５５－２２５４７６７５
ＴＲＡＣ－１４０	ｃｈｒ１４：２２５４７６６７－２２５４７６８７
ＴＲＡＣ－１４１	ｃｈｒ１４：２２５３９０８５－２２５３９１０５
ＴＲＡＣ－１４２	ｃｈｒ１４：２２５４９６３４－２２５４９６５４
ＴＲＡＣ－１４３	ｃｈｒ１４：２２５３９０６４－２２５３９０８４
ＴＲＡＣ－１４４	ｃｈｒ１４：２２５４７６３９－２２５４７６５９
ＴＲＡＣ－１４５	ｃｈｒ１４：２２５４７７３１－２２５４７７５１
ＴＲＡＣ－１４６	ｃｈｒ１４：２２５４７７３４－２２５４７７５４
ＴＲＡＣ－１４７	ｃｈｒ１４：２２５４７５９１－２２５４７６１１
ＴＲＡＣ－１４８	ｃｈｒ１４：２２５４７６５７－２２５４７６７７
ＴＲＡＣ－１４９	ｃｈｒ１４：２２５４７５１９－２２５４７５３９
ＴＲＡＣ－１５０	ｃｈｒ１４：２２５４９６７４－２２５４９６９４
ＴＲＡＣ－１５１	ｃｈｒ１４：２２５４７６７８－２２５４７６９８
ＴＲＡＣ－１５２	ｃｈｒ１４：２２５３９０８７－２２５３９１０７
ＴＲＡＣ－１５３	ｃｈｒ１４：２２５４７５９５－２２５４７６１５
ＴＲＡＣ－１５４	ｃｈｒ１４：２２５４７６３３－２２５４７６５３
ＴＲＡＣ－１５５	ｃｈｒ１４：２２５４７７３２－２２５４７７５２
ＴＲＡＣ－１５６	ｃｈｒ１４：２２５４７６５６－２２５４７６７６
ＴＲＡＣ－１５７	ｃｈｒ１４：２２５３９０８６－２２５３９１０６
ＴＲＡＣ－１５８	ｃｈｒ１４：２２５４７４９１－２２５４７５１１
ＴＲＡＣ－１５９	ｃｈｒ１４：２２５４７６１８－２２５４７６３８
ＴＲＡＣ－１６０	ｃｈｒ１４：２２５４９６４４－２２５４９６６４
ＴＲＡＣ－１６１	ｃｈｒ１４：２２５４７５２２－２２５４７５４２
ＴＲＡＣ－１６２	ｃｈｒ１４：２２５３９０８９－２２５３９１０９
ＴＲＡＣ－１６３	ｃｈｒ１４：２２５３９０６２－２２５３９０８２
ＴＲＡＣ－１６４	ｃｈｒ１４：２２５４７５９７－２２５４７６１７
ＴＲＡＣ－１６５	ｃｈｒ１４：２２５４７６７７－２２５４７６９７
ＴＲＡＣ－１６６	ｃｈｒ１４：２２５４９６４５－２２５４９６６５
ＴＲＡＣ－１６７	ｃｈｒ１４：２２５５０６１０－２２５５０６３０
ＴＲＡＣ－１６８	ｃｈｒ１４：２２５４７５１１－２２５４７５３１
ＴＲＡＣ－１６９	ｃｈｒ１４：２２５５０６０７－２２５５０６２７
ＴＲＡＣ－１７０	ｃｈｒ１４：２２５５０６５７－２２５５０６７７

【表３－４】

ＴＲＡＣ－１７１	ｃｈｒ１４：２２５５０６０４－２２５５０６２４
ＴＲＡＣ－１７２	ｃｈｒ１４：２２５３９１３２－２２５３９１５２
ＴＲＡＣ－１７３	ｃｈｒ１４：２２５５０６３２－２２５５０６５２
ＴＲＡＣ－１７４	ｃｈｒ１４：２２５４７５７１－２２５４７５９１
ＴＲＡＣ－１７５	ｃｈｒ１４：２２５４７７１１－２２５４７７３１
ＴＲＡＣ－１７６	ｃｈｒ１４：２２５４７６６６－２２５４７６８６
ＴＲＡＣ－１７７	ｃｈｒ１４：２２５４７５６７－２２５４７５８７
ＴＲＡＣ－１７８	ｃｈｒ１４：２２５４７６２４－２２５４７６４４
ＴＲＡＣ－１８５	ｃｈｒ１４：２２５４７５０１－２２５４７５２１
ＴＲＡＣ－２１３	ｃｈｒ１４：２２５４７５１９－２２５４７５３９
ＴＲＡＣ－２１４	ｃｈｒ１４：２２５４７５５６－２２５４７５７６
ＴＲＡＣ－２１５	ｃｈｒ１４：２２５４７４８６－２２５４７５０６
ＴＲＡＣ－２１６	ｃｈｒ１４：２２５４７４８７－２２５４７５０７
ＴＲＡＣ－２１７	ｃｈｒ１４：２２５４７４９３－２２５４７５１３
ＴＲＡＣ－２１８	ｃｈｒ１４：２２５４７５０２－２２５４７５２２

から選択されるゲノム座標内にＴＲＡＣの遺伝子修飾を含む、または前記遺伝子修飾が、ｃｈｒ１４：２２５４７５２４－２２５４７５４４、ｃｈｒ１４：２２５４７５２９－２２５４７５４９、ｃｈｒ１４：２２５４７５２５－２２５４７５４５、ｃｈｒ１４：２２５４７５３６－２２５４７５５６、ｃｈｒ１４：２２５４７５０１－２２５４７５２１、ｃｈｒ１４：２２５４７５５６－２２５４７５７６、及びｃｈｒ１４：２２５４７５０２－２２５４７５２２から選択されるゲノム座標内にある、請求項４～６のいずれか１項に記載の操作された細胞。

【請求項８】

前記細胞が、遺伝子修飾を含み、前記遺伝子修飾が、１つ以上のＭＨＣクラスＩタンパク質の発現を阻害する、請求項１～７のいずれか１項に記載の操作された細胞。

【請求項９】

１つ以上のＭＨＣクラスＩタンパク質の発現を阻害する前記遺伝子修飾が、Ｂ２Ｍ配列における遺伝子修飾であり、前記遺伝子修飾が、以下：

【表４－１】

Ｂ２Ｍ　番号：	ゲノム位置　（ｈｇ３８）
Ｂ２Ｍ－１	ｃｈｒ１５：４４７１１４６９－４４７１１４９４
Ｂ２Ｍ－２	ｃｈｒ１５：４４７１１４７２－４４７１１４９７
Ｂ２Ｍ－３	ｃｈｒ１５：４４７１１４８３－４４７１１５０８
Ｂ２Ｍ－４	ｃｈｒ１５：４４７１１４８６－４４７１１５１１
Ｂ２Ｍ－５	ｃｈｒ１５：４４７１１４８７－４４７１１５１２
Ｂ２Ｍ－６	ｃｈｒ１５：４４７１１５１２－４４７１１５３７
Ｂ２Ｍ－７	ｃｈｒ１５：４４７１１５１３－４４７１１５３８
Ｂ２Ｍ－８	ｃｈｒ１５：４４７１１５３４－４４７１１５５９
Ｂ２Ｍ－９	ｃｈｒ１５：４４７１１５６８－４４７１１５９３
Ｂ２Ｍ－１０	ｃｈｒ１５：４４７１１５７３－４４７１１５９８
Ｂ２Ｍ－１１	ｃｈｒ１５：４４７１１５７６－４４７１１６０１
Ｂ２Ｍ－１２	ｃｈｒ１５：４４７１１４６６－４４７１１４９１
Ｂ２Ｍ－１３	ｃｈｒ１５：４４７１１５２２－４４７１１５４７
Ｂ２Ｍ－１４	ｃｈｒ１５：４４７１１５４４－４４７１１５６９
Ｂ２Ｍ－１５	ｃｈｒ１５：４４７１１５５９－４４７１１５８４
Ｂ２Ｍ－１６	ｃｈｒ１５：４４７１１５６５－４４７１１５９０
Ｂ２Ｍ－１７	ｃｈｒ１５：４４７１１５９９－４４７１１６２４
Ｂ２Ｍ－１８	ｃｈｒ１５：４４７１１６１１－４４７１１６３６
Ｂ２Ｍ－１９	ｃｈｒ１５：４４７１５４１２－４４７１５４３７
Ｂ２Ｍ－２０	ｃｈｒ１５：４４７１５４４０－４４７１５４６５
Ｂ２Ｍ－２１	ｃｈｒ１５：４４７１５４７３－４４７１５４９８
Ｂ２Ｍ－２２	ｃｈｒ１５：４４７１５４７４－４４７１５４９９
Ｂ２Ｍ－２３	ｃｈｒ１５：４４７１５５１５－４４７１５５４０
Ｂ２Ｍ－２４	ｃｈｒ１５：４４７１５５３５－４４７１５５６０
Ｂ２Ｍ－２５	ｃｈｒ１５：４４７１５５６２－４４７１５５８７
Ｂ２Ｍ－２６	ｃｈｒ１５：４４７１５５６７－４４７１５５９２
Ｂ２Ｍ－２７	ｃｈｒ１５：４４７１５６７２－４４７１５６９７
Ｂ２Ｍ－２８	ｃｈｒ１５：４４７１５６７３－４４７１５６９８
Ｂ２Ｍ－２９	ｃｈｒ１５：４４７１５６７４－４４７１５６９９
Ｂ２Ｍ－３０	ｃｈｒ１５：４４７１５４１０－４４７１５４３５
Ｂ２Ｍ－３１	ｃｈｒ１５：４４７１５４１１－４４７１５４３６
Ｂ２Ｍ－３２	ｃｈｒ１５：４４７１５４１９－４４７１５４４４
Ｂ２Ｍ－３３	ｃｈｒ１５：４４７１５４３０－４４７１５４５５
Ｂ２Ｍ－３４	ｃｈｒ１５：４４７１５４５７－４４７１５４８２
Ｂ２Ｍ－３５	ｃｈｒ１５：４４７１５４８３－４４７１５５０８

【表４－２】

Ｂ２Ｍ　番号：	ゲノム位置　（ｈｇ３８）
Ｂ２Ｍ－３６	ｃｈｒ１５：４４７１５５１１－４４７１５５３６
Ｂ２Ｍ－３７	ｃｈｒ１５：４４７１５５１５－４４７１５５４０
Ｂ２Ｍ－３８	ｃｈｒ１５：４４７１５６２９－４４７１５６５４
Ｂ２Ｍ－３９	ｃｈｒ１５：４４７１５６３０－４４７１５６５５
Ｂ２Ｍ－４０	ｃｈｒ１５：４４７１５６３１－４４７１５６５６
Ｂ２Ｍ－４１	ｃｈｒ１５：４４７１Ｓ６３２－４４７１５６５７
Ｂ２Ｍ－４２	ｃｈｒ１５：４４７１５６５３－４４７１５６７８
Ｂ２Ｍ－４３	ｃｈｒ１５：４４７１５６５７－４４７１５６８２
Ｂ２Ｍ－４４	ｃｈｒ１５：４４７１５６６６－４４７１５６９１
Ｂ２Ｍ－４５	ｃｈｒ１５：４４７１５６８５－４４７１５７１０
Ｂ２Ｍ－４６	ｃｈｒ１５：４４７１５６８６－４４７１５７１１
Ｂ２Ｍ－４７	ｃｈｒ１５：４４７１６３２６－４４７１６３５１
Ｂ２Ｍ－４８	ｃｈｒ１５：４４７１６３２９－４４７１６３５４
Ｂ２Ｍ－４９	ｃｈｒ１５：４４７１６３１３－４４７１６３３８
Ｂ２Ｍ－５０	ｃｈｒ１５：４４７１７５９９－４４７１７６２４
Ｂ２Ｍ－５１	ｃｈｒ１５：４４７１７６０４－４４７１７６２９
Ｂ２Ｍ－５２	ｃｈｒ１５：４４７１７６８１－４４７１７７０６
Ｂ２Ｍ－５３	ｃｈｒ１５：４４７１７６８２－４４７１７７０７
Ｂ２Ｍ－５４	ｃｈｒ１５：４４７１７７０２－４４７１７７２７
Ｂ２Ｍ－５５	ｃｈｒ１５：４４７１７７６４－４４７１７７８９
Ｂ２Ｍ－５６	ｃｈｒ１５：４４７１７７７６－４４７１７８０１
Ｂ２Ｍ－５７	ｃｈｒ１５：４４７１７７８６－４４７１７８１１
Ｂ２Ｍ－５８	ｃｈｒ１５：４４７１７７８９－４４７１７８１４
Ｂ２Ｍ－５９	ｃｈｒ１５：４４７１７７９０－４４７１７８１５
Ｂ２Ｍ－６０	ｃｈｒ１５：４４７１７７９４－４４７１７８１９
Ｂ２Ｍ－６１	ｃｈｒ１５：４４７１７８０５－４４７１７８３０
Ｂ２Ｍ－６２	ｃｈｒ１５：４４７１７８０８－４４７１７８３３
Ｂ２Ｍ－６３	ｃｈｒ１５：４４７１７８０９－４４７１７８３４
Ｂ２Ｍ－６４	ｃｈｒ１５：４４７１７８１０－４４７１７８３５
Ｂ２Ｍ－６５	ｃｈｒ１５：４４７１７８４６－４４７１７８７１
Ｂ２Ｍ－６６	ｃｈｒ１５：４４７１７９４５－４４７１７９７０
Ｂ２Ｍ－６７	ｃｈｒ１５：４４７１７９４６－４４７１７９７１
Ｂ２Ｍ－６８	ｃｈｒ１５：４４７１７９４７－４４７１７９７２
Ｂ２Ｍ－６９	ｃｈｒ１５：４４７１７９４８－４４７１７９７３
Ｂ２Ｍ－７０	ｃｈｒ１５：４４７１７９７３－４４７１７９９８
Ｂ２Ｍ－７１	ｃｈｒ１５：４４７１７９８１－４４７１８００６

【表４－３】

Ｂ２Ｍ　番号：	ゲノム位置　（ｈｇ３８）
Ｂ２Ｍ－７２	ｃｈｒ１５：４４７１８０５６－４４７１８０８１
Ｂ２Ｍ－７３	ｃｈｒ１５：４４７１８０６１－４４７１８０８６
Ｂ２Ｍ－７４	ｃｈｒ１５：４４７１８０６７－４４７１８０９２
Ｂ２Ｍ－７５	ｃｈｒ１５：４４７１８０７６－４４７１８１０１
Ｂ２Ｍ－７６	ｃｈｒ１５：４４７１７５８９－４４７１７６１４
Ｂ２Ｍ－７７	ｃｈｒ１５：４４７１７６２０－４４７１７６４５
Ｂ２Ｍ－７８	ｃｈｒ１５：４４７１７６４２－４４７１７６６７
Ｂ２Ｍ－７９	ｃｈｒ１５：４４７１７７７１－４４７１７７９６
Ｂ２Ｍ－８０	ｃｈｒ１５：４４７１７８００－４４７１７８２５
Ｂ２Ｍ－８１	ｃｈｒ１５：４４７１７８５９－４４７１７８８４
Ｂ２Ｍ－８２	ｃｈｒ１５：４４７１７９４７－４４７１７９７２
Ｂ２Ｍ－８３	ｃｈｒ１５：４４７１８１１９－４４７１８１４４

から選択されるゲノム座標内にある、請求項８に記載の操作された細胞。

【請求項１０】

１つ以上のＭＨＣクラスＩタンパク質の発現を阻害する前記遺伝子修飾が、ＨＬＡ－Ａ配列における遺伝子修飾であり、任意選択で、前記遺伝子修飾が、ｃｈｒ６：２９９４２８５４－ｃｈｒ６：２９９４２９１３及びｃｈｒ６：２９９４３５１８－ｃｈｒ６：２９９４３６１９から選択されるゲノム座標、任意選択で、ｃｈｒ６：２９９４２８６４－２９９４２８８４、ｃｈｒ６：２９９４２８６８－２９９４２８８８、ｃｈｒ６：２９９４２８７６－２９９４２８９６、ｃｈｒ６：２９９４２８７７－２９９４２８９７、ｃｈｒ６：２９９４２８８３－２９９４２９０３、ｃｈｒ６：２９９４３１２６－２９９４３１４６、ｃｈｒ６：２９９４３５２８－２９９４３５４８、ｃｈｒ６：２９９４３５２９－２９９４３５４９、ｃｈｒ６：２９９４３５３０－２９９４３５５０、ｃｈｒ６：２９９４３５３７－２９９４３５５７、ｃｈｒ６：２９９４３５４９－２９９４３５６９、ｃｈｒ６：２９９４３５８９－２９９４３６０９、及びｃｈｒ６：２９９４４０２６－２９９４４０４６から選択されるゲノム座標内にある、請求項８に記載の操作された細胞。

【請求項１１】

前記細胞が、遺伝子修飾を含み、前記遺伝子修飾が、１つ以上のＭＨＣクラスＩＩタンパク質の発現を阻害する、請求項１～１０のいずれか１項に記載の操作された細胞。

【請求項１２】

１つ以上のＭＨＣクラスＩＩタンパク質の発現を阻害する前記遺伝子修飾が、ＣＩＩＴＡ配列における遺伝子修飾であり、前記遺伝子修飾が、ｃｈｒ：１６：１０９０２１７１－１０９２３２４２、任意選択で、ｃｈｒ１６：１０９０２６６２－１０９２３２８５、ｃｈｒ１６：１０９０６５４２－１０９２３２８５、またはｃｈｒ１６：１０９０６５４２－１０９０８１２１、任意選択で、ｃｈｒ１６：１０９０８１３２－１０９０８１５２、ｃｈｒ１６：１０９０８１３１－１０９０８１５１、ｃｈｒ１６：１０９１６４５６－１０９１６４７６、ｃｈｒ１６：１０９１８５０４－１０９１８５２４、ｃｈｒ１６：１０９０９０２２－１０９０９０４２、ｃｈｒ１６：１０９１８５１２－１０９１８５３２、ｃｈｒ１６：１０９１８５１１－１０９１８５３１、ｃｈｒ１６：１０８９５７４２－１０８９５７６２、ｃｈｒ１６：１０９１６３６２－１０９１６３８２、ｃｈｒ１６：１０９１６４５５－１０９１６４７５、ｃｈｒ１６：１０９０９１７２－１０９０９１９２、ｃｈｒ１６：１０９０６４９２－１０９０６５１２、ｃｈｒ１６：１０９０９００６－１０９０９０２６、ｃｈｒ１６：１０９２２４７８－１０９２２４９８、ｃｈｒ１６：１

０８９５７４７－１０８９５７６７、ｃｈｒ１６：１０９１６３４８－１０９１６３６８、ｃｈｒ１６：１０９１０１８６－１０９１０２０６、ｃｈｒ１６：１０９０６４８１－１０９０６５０１、ｃｈｒ１６：１０９０９００７－１０９０９０２７、ｃｈｒ１６：１０８９５４１０－１０８９５４３０、及びｃｈｒ１６：１０９０８１３０－１０９０８１５０、任意選択で、ｃｈｒ１６：１０９１８５０４－１０９１８５２４、ｃｈｒ１６：１０９２３２１８－１０９２３２３８、ｃｈｒ１６：１０９２３２１９－１０９２３２３９、ｃｈｒ１６：１０９２３２２１－１０９２３２４１、ｃｈｒ１６：１０９０６４８６－１０９０６５０６、ｃｈｒ１６：１０９０６４８５－１０９０６５０５、ｃｈｒ１６：１０９０３８７３－１０９０３８９３、ｃｈｒ１６：１０９０９１７２－１０９０９１９２、ｃｈｒ１６：１０９１８４２３－１０９１８４４３、ｃｈｒ１６：１０９１６３６２－１０９１６３８２、ｃｈｒ１６：１０９１６４５０－１０９１６４７０、ｃｈｒ１６：１０９２２１５３－１０９２２１７３、ｃｈｒ１６：１０９２３２２２－１０９２３２４２、ｃｈｒ１６：１０９１０１７６－１０９１０１９６、ｃｈｒ１６：１０８９５７４２－１０８９５７６２、ｃｈｒ１６：１０９１６４４９－１０９１６４６９、ｃｈｒ１６：１０９２３２１４－１０９２３２３４、ｃｈｒ１６：１０９０６４９２－１０９０６５１２、及びｃｈｒ１６：１０９０６４８７－１０９０６５０、または任意選択で、ｃｈｒ１６：１０９１６４３２－１０９１６４５２、ｃｈｒ１６：１０９２２４４４－１０９２２４６４、ｃｈｒ１６：１０９０７９２４－１０９０７９４４、ｃｈｒ１６：１０９０６９８５－１０９０７００５、ｃｈｒ１６：１０９０８０７３－１０９０８０９３、ｃｈｒ１６：１０９０７４３３－１０９０７４５３、ｃｈｒ１６：１０９０７９７９－１０９０７９９９、ｃｈｒ１６：１０９０７１３９－１０９０７１５９、ｃｈｒ１６：１０９２２４３５－１０９２２４５５、ｃｈｒ１６：１０９０７３８４－１０９０７４０４、ｃｈｒ１６：１０９０７４３４－１０９０７４５４、ｃｈｒ１６：１０９０７１１９－１０９０７１３９、ｃｈｒ１６：１０９０７５３９－１０９０７５５９、ｃｈｒ１６：１０９０７８１０－１０９０７８３０、ｃｈｒ１６：１０９０７３１５－１０９０７３３５、ｃｈｒ１６：１０９１６４２６－１０９１６４４６、ｃｈｒ１６：１０９０９１３８－１０９０９１５８、ｃｈｒ１６：１０９０８１０１－１０９０８１２１、ｃｈｒ１６：１０９０７７９０－１０９０７８１０、ｃｈｒ１６：１０９０７７８７－１０９０７８０７、ｃｈｒ１６：１０９０７４５４－１０９０７４７４、ｃｈｒ１６：１０８９５７０２－１０８９５７２２、ｃｈｒ１６：１０９０２７２９－１０９０２７４９、ｃｈｒ１６：１０９１８４９２－１０９１８５１２、ｃｈｒ１６：１０９０７９３２－１０９０７９５２、ｃｈｒ１６：１０９０７６２３－１０９０７６４３、ｃｈｒ１６：１０９０７４６１－１０９０７４８１、ｃｈｒ１６：１０９０２７２３－１０９０２７４３、ｃｈｒ１６：１０９０７６２２－１０９０７６４２、ｃｈｒ１６：１０９２２４４１－１０９２２４６１、ｃｈｒ１６：１０９０２６６２－１０９０２６８２、ｃｈｒ１６：１０９１５６２６－１０９１５６４６、ｃｈｒ１６：１０９１５５９２－１０９１５６１２、ｃｈｒ１６：１０９０７３８５－１０９０７４０５、ｃｈｒ１６：１０９０７０３０－１０９０７０５０、ｃｈｒ１６：１０９０７９３５－１０９０７９５５、ｃｈｒ１６：１０９０６８５３－１０９０６８７３、ｃｈｒ１６：１０９０６７５７－１０９０６７７７、ｃｈｒ１６：１０９０７７３０－１０９０７７５０、及びｃｈｒ１６：１０８９５３０２－１０８９５３２２から選択されるゲノム座標内にある、請求項１１に記載の操作された細胞。

【請求項１３】

前記細胞が、ＬＡＧ３タンパク質の細胞表面発現が低減されているか、または前記細胞が、ＬＡＧ３タンパク質の細胞表面発現が低減されており、かつ前記細胞では、ＴＲＡＣタンパク質もしくはＴＲＢＣタンパク質の細胞表面発現が低減している、請求項１～１２のいずれか１項に記載の操作された細胞。

【請求項１４】

ｃｈｒ１：１６０８３０１６０－１６０８６２８８７のゲノム座標内に、ヒト２Ｂ４／ＣＤ２４４配列における遺伝子修飾を含む、請求項１～１３のいずれか１項に記載の操作された細胞。

【請求項１５】
２Ｂ４／ＣＤ２４４における前記遺伝子修飾が、以下：
【表５－１】

２Ｂ４番号	ゲノム座標　（ｈｇ３８）
２Ｂ４－１	ｃｈｒ１：１６０８４１６１１－１６０８４１６３１
２Ｂ４－２	ｃｈｒ１：１６０８４１８６５－１６０８４１８８５
２Ｂ４－３	ｃｈｒ１：１６０８６２６２４－１６０８６２６４４
２Ｂ４－４	ｃｈｒ１：１６０８６２６７１－１６０８６２６９１
２Ｂ４－５	ｃｈｒ１：１６０８４１６２２－１６０８４１６４２
２Ｂ４－６	ｃｈｒ１：１６０８４１８１９－１６０８４１８３９
２Ｂ４－７	ｃｈｒ１：１６０８４１８２３－１６０８４１８４３
２Ｂ４－８	ｃｈｒ１：１６０８４１７１７－１６０８４１７３７
２Ｂ４－９	ｃｈｒ１：１６０８４１８５９－１６０８４１８７９
２Ｂ４－１０	ｃｈｒ１：１６０８４１８０６－１６０８４１８２６
２Ｂ４－１１	ｃｈｒ１：１６０８４１８３４－１６０８４１８５４
２Ｂ４－１２	ｃｈｒ１：１６０８４１７８０－１６０８４１８００
２Ｂ４－１３	ｃｈｒ１：１６０８４１７１３－１６０８４１７３３
２Ｂ４－１４	ｃｈｒ１：１６０８４１６３１－１６０８４１６５１
２Ｂ４－１５	ｃｈｒ１：１６０８４１７０４－１６０８４１７２４
２Ｂ４－１６	ｃｈｒ１：１６０８４１５８４－１６０８４１６０４
２Ｂ４－１７	ｃｈｒ１：１６０８４１６７９－１６０８４１６９９
２Ｂ４－１８	ｃｈｒ１：１６０８４１８７４－１６０８４１８９４
２Ｂ４－１９	ｃｈｒ１：１６０８４１７５０－１６０８４１７７０

【表５－２】

２Ｂ４番号	ゲノム座標　（ｈｇ３８）
２Ｂ４－２０	ｃｈｒ１：１６０８４１５７７－１６０８４１５９７
２Ｂ４－２１	ｃｈｒ１：１６０８４１４５９－１６０８４１４７９
２Ｂ４－２２	ｃｈｒ１：１６０８４１４６６－１６０８４１４８６
２Ｂ４－２３	ｃｈｒ１：１６０８４１４６１－１６０８４１４８１
２Ｂ４－２４	ｃｈｒ１：１６０８４１４６０－１６０８４１４８０
２Ｂ４－２５	ｃｈｒ１：１６０８４１３６０－１６０８４１３８０
２Ｂ４－２６	ｃｈｒ１：１６０８４１３０４－１６０８４１３２４
２Ｂ４－２７	ｃｈｒ１：１６０８４１１９５－１６０８４１２１５
２Ｂ４－２８	ｃｈｒ１：１６０８４１３０５－１６０８４１３２５

から選択されるゲノム座標：または、２Ｂ４－１～２Ｂ４－５によって標的とされるものから選択されるゲノム座標：ｃｈｒ１：１６０８４１６１１－１６０８４１６３１、ｃｈｒ１：１６０８４１８６５－１６０８４１８８５、ｃｈｒ１：１６０８６２６２４－１６０８６２６４４、ｃｈｒ１：１６０８６２６７１－１６０８６２６９１、及びｃｈｒ１：１６０８４１６２２－１６０８４１６４２、または

２Ｂ４－１及び２Ｂ４－２によって標的とされるものから選択されるゲノム座標：ｃｈｒ１：１６０８４１６１１－１６０８４１６３１及びｃｈｒ１：１６０８４１８６５－１６０８４１８８５、または
２Ｂ４－３、２Ｂ４－４、２Ｂ４－１０、及び２Ｂ４－１７によって標的とされるものから選択されるゲノム座標：ｃｈｒ１：１６０８６２６２４－１６０８６２６４４、ｃｈｒ１：１６０８６２６７１－１６０８６２６９１、ｃｈｒ１：１６０８４１８０６－１６０８４１８２６、及びｃｈｒ１：１６０８４１６７９－１６０８４１６９９内にある、請求項１４に記載の操作された細胞。

【請求項１６】

ｃｈｒ５：１５７０８５８３２－１５７１０９０４４のゲノム座標内に、ヒトＴＩＭ３配列における遺伝子修飾を含む、請求項１～１５のいずれか１項に記載の操作された細胞。

【請求項１７】

ＴＩＭ３における前記遺伝子修飾が、以下：

【表６】

ＴＩＭ３番号	ゲノム座標（ｈｇ３８）
ＴＩＭ３－１	ｃｈｒ５：１５７１０６８６７－１５７１０６８８７
ＴＩＭ３－２	ｃｈｒ５：１５７１０６８６２－１５７１０６８８２
ＴＩＭ３－３	ｃｈｒ５：１５７１０６８０３－１５７１０６８２３
ＴＩＭ３－４	ｃｈｒ５：１５７１０６８５０－１５７１０６８７０
ＴＩＭ３－５	ｃｈｒ５：１５７１０４７２６－１５７１０４７４６
ＴＩＭ３－６	ｃｈｒ５：１５７１０６６６８－１５７１０６６８８
ＴＩＭ３－７	ｃｈｒ５：１５７１０４６８１－１５７１０４７０１
ＴＩＭ３－８	ｃｈｒ５：１５７１０４６８１－１５７１０４７０１
ＴＩＭ３－９	ｃｈｒ５：１５７１０４６８０－１５７１０４７００
ＴＩＭ３－１０	ｃｈｒ５：１５７１０６６７６－１５７１０６６９６
ＴＩＭ３－１１	ｃｈｒ５：１５７０８７２７１－１５７０８７２９１
ＴＩＭ３－１２	ｃｈｒ５：１５７０９５４３２－１５７０９５４５２
ＴＩＭ３－１３	ｃｈｒ５：１５７０９５３６１－１５７０９５３８１
ＴＩＭ３－１４	ｃｈｒ５：１５７０９５３６０－１５７０９５３８０
ＴＩＭ３－１５	ｃｈｒ５：１５７１０８９４５－１５７１０８９６５
ＴＩＭ３－１８	ｃｈｒ５：１５７１０６７５１－１５７１０６７７１
ＴＩＭ３－１９	ｃｈｒ５：１５７０９５４１９－１５７０９５４３９
ＴＩＭ３－２２	ｃｈｒ５：１５７１０４６７９－１５７１０４６９９
ＴＩＭ３－２３	ｃｈｒ５：１５７１０６８２４－１５７１０６８４４
ＴＩＭ３－２６	ｃｈｒ５：１５７０８７１１７－１５７０８７１３７
ＴＩＭ３－２９	ｃｈｒ５：１５７０９５３７９－１５７０９５３９９
ＴＩＭ３－３２	ｃｈｒ５：１５７１０６８６４－１５７１０６８８４
ＴＩＭ３－４２	ｃｈｒ５：１５７０９５４０５－１５７０９５４２５
ＴＩＭ３－４４	ｃｈｒ５：１５７０９５４０４－１５７０９５４２４
ＴＩＭ３－５６	ｃｈｒ５：１５７１０６８８８－１５７１０６９０８
ＴＩＭ３－５８	ｃｈｒ５：１５７０８７１２６－１５７０８７１４６
ＴＩＭ３－５９	ｃｈｒ５：１５７０８７２５３－１５７０８７２７３
ＴＩＭ３－６２	ｃｈｒ５：１５７１０６８８９－１５７１０６９０９
ＴＩＭ３－６３	ｃｈｒ５：１５７１０６９３５－１５７１０６９５５
ＴＩＭ３－６６	ｃｈｒ５：１５７１０６６４１－１５７１０６６６１
ＴＩＭ３－６９	ｃｈｒ５：１５７０８７０８４－１５７０８７１０４
ＴＩＭ３－７５	ｃｈｒ５：１５７１０４６６３－１５７１０４６８３
ＴＩＭ３－８２	ｃｈｒ５：１５７１０６８７５－１５７１０６８９５
ＴＩＭ３－８６	ｃｈｒ５：１５７０８７１８４－１５７０８７２０４
ＴＩＭ３－８７	ｃｈｒ５：１５７１０６９３６－１５７１０６９５６
ＴＩＭ３－８８	ｃｈｒ５：１５７１０４６９６－１５７１０４７１６

から選択されるゲノム座標、または、

ＴＩＭ３－１～ＴＩＭ３－４、ＴＩＭ３－６～ＴＩＭ３－１５、ＴＩＭ３－１８、ＴＩＭ３－１９、ＴＩＭ３－２２、ＴＩＭ３－２９、ＴＩＭ３－４２、ＴＩＭ３－４４、ＴＩＭ３－５８、ＴＩＭ３－６２、ＴＩＭ３－６９、ＴＩＭ３－８２、ＴＩＭ３－８６、ａｎｄ　ＴＩＭ３－８８：ｃｈｒ５：１５７１０６８６７－１５７１０６８８７、ｃｈｒ５：１５７１０６８６２－１５７１０６８８２、ｃｈｒ５：１５７１０６８０３－１５７１０６８２３、ｃｈｒ５：１５７１０６８５０－１５７１０６８７０、ｃｈｒ５：１５７１０６６６８－１５７１０６６８８、ｃｈｒ５：１５７１０４６８１－１５７１０４７０１、ｃｈｒ５：１５７１０４６８１－１５７１０４７０１、ｃｈｒ５：１５７１０４６８０－

１５７１０４７００、ｃｈｒ５：１５７１０６６７６－１５７１０６６９６、ｃｈｒ５：１５７０８７２７１－１５７０８７２９１、ｃｈｒ５：１５７０９５４３２－１５７０９５４５２、ｃｈｒ５：１５７０９５３６１－１５７０９５３８１、ｃｈｒ５：１５７０９５３６０－１５７０９５３８０、ｃｈｒ５：１５７１０８９４５－１５７１０８９６５、ｃｈｒ５：１５７１０６７５１－１５７１０６７７１、ｃｈｒ５：１５７０９５４１９－１５７０９５４３９、ｃｈｒ５：１５７１０４６７９－１５７１０４６９９、ｃｈｒ５：１５７０９５３７９－１５７０９５３９９、ｃｈｒ５：１５７０９５４０５－１５７０９５４２５、ｃｈｒ５：１５７０９５４０４－１５７０９５４２４、ｃｈｒ５：１５７０８７１２６－１５７０８７１４６、ｃｈｒ５：１５７１０６８８９－１５７１０６９０９、ｃｈｒ５：１５７０８７０８４－１５７０８７１０４、ｃｈｒ５：１５７１０６８７５－１５７１０６８９５、ｃｈｒ５：１５７０８７１８４－１５７０８７２０４、及び、ｃｈｒ５：１５７１０４６９６－１５７１０４７１６によって標的とされるものから選択されるゲノム座標；または

ＴＩＭ３－１～ＴＩＭ３－５、ＴＩＭ３－７、ＴＩＭ３－８、ＴＩＭ３－１２～ＴＩＭ３－１５、ＴＩＭ３－２３、ＴＩＭ３－２６、ＴＩＭ３－３２、ＴＩＭ３－５６、ＴＩＭ３－５９、ＴＩＭ３－６３、ＴＩＭ３－６６、ＴＩＭ３－７５、及び、ＴＩＭ３－８７：ｃｈｒ５：１５７１０６８６７－１５７１０６８８７、ｃｈｒ５：１５７１０６８６２－１５７１０６８８２、ｃｈｒ５：１５７１０６８０３－１５７１０６８２３、ｃｈｒ５：１５７１０６８５０－１５７１０６８７０、ｃｈｒ５：１５７１０６６６８－１５７１０６６８８、ｃｈｒ５：１５７１０４６８１－１５７１０４７０１、ｃｈｒ５：１５７１０４６８１－１５７１０４７０１、ｃｈｒ５：１５７０９５４３２－１５７０９５４５２、ｃｈｒ５：１５７０９５３６１－１５７０９５３８１、ｃｈｒ５：１５７０９５３６０－１５７０９５３８０、ｃｈｒ５：１５７１０８９４５－１５７１０８９６５、ｃｈｒ５：１５７１０６８２４－１５７１０６８４４、ｃｈｒ５：１５７０８７１１７－１５７０８７１３７、ｃｈｒ５：１５７１０６８６４－１５７１０６８８４、ｃｈｒ５：１５７１０６８８８－１５７１０６９０８、ｃｈｒ５：１５７０８７２５３－１５７０８７２７３、ｃｈｒ５：１５７１０６９３５－１５７１０６９５５、ｃｈｒ５：１５７１０６６４１－１５７１０６６６１、ｃｈｒ５：１５７１０４６６３－１５７１０４６８３、及び、ｃｈｒ５：１５７１０６９３６－１５７１０６９５６によって標的とされるものから選択されるゲノム座標；または；

ＴＩＭ３－２、ＴＩＭ３－４、ＴＩＭ３－１５、ＴＩＭ３－２３、ＴＩＭ３－５６、ＴＩＭ３－５９、ＴＩＭ３－６３、ＴＩＭ３－７５、及び、ＴＩＭ３－８７：ｃｈｒ５：１５７１０６８６２－１５７１０６８８２、ｃｈｒ５：１５７１０６８５０－１５７１０６８７０、ｃｈｒ５：１５７１０８９４５－１５７１０８９６５、ｃｈｒ５：１５７１０６８２４－１５７１０６８４４、ｃｈｒ５：１５７１０６８８８－１５７１０６９０８、ｃｈｒ５：１５７０８７２５３－１５７０８７２７３、ｃｈｒ５：１５７１０６９３５－１５７１０６９５５、ｃｈｒ５：１５７１０４６６３－１５７１０４６８３、及び、ｃｈｒ５：１５７１０６９３６－１５７１０６９５６、それぞれによって標的とされるものから選択されるゲノム座標；または

ＴＩＭ３－１～ＴＩＭ３－４：ｃｈｒ５：１５７１０６８６７－１５７１０６８８７、ｃｈｒ５：１５７１０６８６２－１５７１０６８８２、ｃｈｒ５：１５７１０６８０３－１５７１０６８２３、及び、ｃｈｒ５：１５７１０６８５０－１５７１０６８７０によって標的とされるものから選択されるゲノム座標；または

ＴＩＭ３－２、ＴＩＭ－４、及び、ＴＩＭ３－１５：ｃｈｒ５：１５７１０６８６２－１５７１０６８８２、ｃｈｒ５：１５７１０６８５０－１５７１０６８７０、及び、ｃｈｒ５：１５７１０８９４５－１５７１０８９６５によって標的とされるものから選択されるゲノム座標；または

ＴＩＭ３－２、ＴＩＭ－４、ＴＩＭ３－１５、ＴＩＭ３－６３、及び、ＴＩＭ３－８７：ｃｈｒ５：１５７１０６８６２－１５７１０６８８２、ｃｈｒ５：１５７１０６８５０－１５７１０６８７０、ｃｈｒ５：１５７１０８９４５－１５７１０８９６５、ｃｈｒ５

：１５７１０６９３５－１５７１０６９５５、及び、ｃｈｒ５：１５７１０６９３６－１５７１０６９５６、それぞれによって標的とされるものから選択されるゲノム座標；または

ＴＩＭ３－２、及び、ＴＩＭ３－１５：ｃｈｒ５：１５７１０６８６２－１５７１０６８８２、及び、ｃｈｒ５：１５７１０８９４５－１５７１０８９６５によって標的とされるものから選択されるゲノム座標；または

ＴＩＭ３－６３、及び、ＴＩＭ３－８７：ｃｈｒ５：１５７１０６９３５－１５７１０６９５５、及び、ｃｈｒ５：１５７１０６９３６－１５７１０６９５６によって標的とされるものから選択されるゲノム座標；または

ＴＩＭ３－１５：ｃｈｒ５：１５７１０８９４５－１５７１０８９６５によって標的とされるものから選択されるゲノム座標内にある、請求項１６に記載の操作された細胞。

【請求項１８】

ｃｈｒ２：２４１８４９８８１－２４１８５８９０８のゲノム座標内に、ヒトＰＤ－１配列における遺伝子修飾を含む、請求項１～１７のいずれか１項に記載の操作された細胞。

【請求項１９】

前記遺伝子修飾が、以下：

【表７】

ＰＤ１番号	ゲノム座標　（ｈｇ３８）
ＰＤ１－２９	ｃｈｒ２：２４１８５２７０３－２４１８５２７２３
ＰＤ１－４３	ｃｈｒ２：２４１８５８８０７－２４１８５８８２７
ＰＤ１－５	ｃｈｒ２：２４１８５８７８９－２４１８５８８０９
ＰＤ１－６	ｃｈｒ２：２４１８５８７８８－２４１８５８８０８
ＰＤ１－８	ｃｈｒ２：２４１８５８７５５－２４１８５８７７５
ＰＤ１－１１	ｃｈｒ２：２４１８５２９１９－２４１８５２９３９
ＰＤ１－１２	ｃｈｒ２：２４１８５２９１５－２４１８５２９３５
ＰＤ１－２２	ｃｈｒ２：２４１８５２７５５－２４１８５２７７５
ＰＤ１－２３	ｃｈｒ２：２４１８５２７５１－２４１８５２７７１
ＰＤ１－２４	ｃｈｒ２：２４１８５２７５０－２４１８５２７７０
ＰＤ１－３６	ｃｈｒ２：２４１８５２２６４－２４１８５２２８４
ＰＤ１－５７	ｃｈｒ２：２４１８５２２０１－２４１８５２２２１
ＰＤ１－５８	ｃｈｒ２：２４１８５２７４９－２４１８５２７６９
ＰＤ１－１７	ｃｈｒ２：２４１８５２８２１－２４１８５２８４１
ＰＤ１－３８	ｃｈｒ２：２４１８５２２６５－２４１８５２２８５
ＰＤ１－５６	ｃｈｒ２：２４１８５１２２１－２４１８５１２４１
ＰＤ１－４１	ｃｈｒ２：２４１８５２１８８－２４１８５２２０８

から選択されるゲノム座標：または、それぞれ、ｃｈｒ２：２４１８５２９１９－２４１８５２９３９、ｃｈｒ２：２４１８５２９１５－２４１８５２９３５、ｃｈｒ２：２４１８５２７５０－２４１８５２７７０、ｃｈｒ２：２４１８５２２６４－２４１８５２２８４、ｃｈｒ２：２４１８５２２６５－２４１８５２２８５、ｃｈｒ２：２４１８５８８０７－２４１８５８８２７、ｃｈｒ２：２４１８５２２０１－２４１８５２２２１、ｃｈｒ２：２４１８５８７８９－２４１８５８８０９、ｃｈｒ２：２４１８５８７８８－２４１８５８８０８、ｃｈｒ２：２４１８５８７５５－２４１８５８７７５、ｃｈｒ２：２４１８５２７５５－２４１８５２７７５、ｃｈｒ２：２４１８５２７５１－２４１８５２７

７１、及びｃｈｒ２：２４１８５２７０３－２４１８５２７２３から選択されるゲノム座標、または
それぞれ、ｃｈｒ２：２４１８５８７８８－２４１８５８８０８、ｃｈｒ２：２４１８５８７５５－２４１８５８７７５、ｃｈｒ２：２４１８５２９１９－２４１８５２９３９、ｃｈｒ２：２４１８５２９１５－２４１８５２９３５、ｃｈｒ２：２４１８５２７５１－２４１８５２７７１、ｃｈｒ２：２４１８５８８０７－２４１８５８８２７、及びｃｈｒ２：２４１８５２７０３－２４１８５２７２３から選択されるゲノム座標、または
それぞれ、ｃｈｒ２：２４１８５８７８９－２４１８５８８０９、ｃｈｒ２：２４１８５２９１９－２４１８５２９３９、ｃｈｒ２：２４１８５２９１５－２４１８５２９３５、ｃｈｒ２：２４１８５２７５５－２４１８５２７７５、ｃｈｒ２：２４１８５２７５１－２４１８５２７７１、及びｃｈｒ２：２４１８５８８０７－２４１８５８８２７から選択されるゲノム座標、または
それぞれ、ｃｈｒ２：２４１８５８７８８－２４１８５８８０８、ｃｈｒ２：２４１８５８７５５－２４１８５８７７５、ｃｈｒ２：２４１８５２７５１－２４１８５２７７１、及びｃｈｒ２：２４１８５２７０３－２４１８５２７２３から選択されるゲノム座標、または
それぞれ、ｃｈｒ２：２４１８５８７８８－２４１８５８８０８及びｃｈｒ２：２４１８５２７０３－２４１８５２７２３から選択されるゲノム座標、または
それぞれ、ｃｈｒ２：２４１８５８７８８－２４１８５８８０８、ｃｈｒ２：２４１８５２７５１－２４１８５２７７１、ｃｈｒ２：２４１８５２７０３－２４１８５２７２３、ｃｈｒ２：２４１８５２１８８－２４１８５２２０８、及びｃｈｒ２：２４１８５２２０１－２４１８５２２２１から選択されるゲノム座標、または
それぞれ、ｃｈｒ２：２４１８５８７８８－２４１８５８８０８、ｃｈｒ２：２４１８５２７０３－２４１８５２７２３、及びｃｈｒ２：２４１８５２２０１－２４１８５２２２１から選択されるゲノム座標、または
ｃｈｒ２：２４１８５８８０７－２４１８５８８２７のゲノム座標内に少なくとも１個のヌクレオチドの修飾を含む、請求項１８に記載の操作された細胞。
【請求項２０】
前記遺伝子修飾が、インデルを含む、請求項１～１９のいずれか１項に記載の操作された細胞。
【請求項２１】
前記遺伝子修飾が、異種コード配列の挿入を含む、請求項１～２０のいずれか１項に記載の操作された細胞。
【請求項２２】
前記遺伝子修飾が、置換を含み、任意選択で、前記置換が、ＣからＴへの置換またはＡからＧへの置換を含む、請求項１～２１のいずれか１項に記載の操作された細胞。
【請求項２３】
前記遺伝子修飾により、遺伝子修飾前に、全長タンパク質のアミノ酸配列を有する前記全長タンパク質の翻訳を妨げる、前記核酸配列の変化がもたらされ、任意選択で、前記遺伝子修飾により、前記全長タンパク質のコード配列における早期終止コドンをもたらす前記核酸配列の変化がもたらされるか、または前記ゲノム遺伝子座からのｐｒｅ－ｍＲＮＡのスプライシングの変化がもたらされる、請求項１～２２のいずれか１項に記載の操作された細胞。
【請求項２４】
前記細胞が、前記操作された細胞の前記表面上で発現される標的化受容体をコードする外因性核酸を含み、任意選択で、前記標的化受容体が、ＣＡＲまたはＴＣＲである、請求項１～２３のいずれか１項に記載の操作された細胞。
【請求項２５】
前記操作された細胞が、Ｔ細胞である、請求項１～２４のいずれか１項に記載の操作された細胞。

【請求項２６】
請求項１～２５のいずれか１項に記載の操作された細胞を含む、薬学的組成物。
【請求項２７】
請求項１～２５のいずれか１項に記載の操作された細胞を含む、細胞集団。
【請求項２８】
請求項１～２７のいずれか１項に記載の操作された細胞、細胞集団、または薬学的組成物を必要とする対象に投与する、方法。
【請求項２９】
請求項１～２７のいずれか１項に記載の操作された細胞、細胞集団、または薬学的組成物を、養子細胞移植（ＡＣＴ）療法として対象に投与する方法。
【請求項３０】
ＡＣＴ療法として使用するための、請求項１～２７のいずれか１項に記載の操作された細胞、細胞集団、または薬学的組成物。
【請求項３１】
ａ．配列番号１～１７、２４、２６、４１、５９、及び８３から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列、
ｂ．配列番号１～１７、２４、２６、４１、５９、及び８３の配列から選択されるヌクレオチド配列の少なくとも１７、１８、１９、または２０個の連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むガイド配列、
ｃ．配列番号１～１７、２４、２６、４１、５９、及び８３から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも９５％同一または少なくとも９０％同一のヌクレオチド配列を含むガイド配列、
ｄ．配列番号１～１５から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列、
ｅ．配列番号１～１１から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列、
ｆ．配列番号１～４から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列、
ｇ．配列番号１～４から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列、及び
ｈ．配列番号１、４、５及び９から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列、
を含むＬＡＧ３配列に特異的にハイブリダイズする、ＬＡＧ３ガイドＲＮＡ。
【請求項３２】
ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を、配列番号１～１７、２４、２６、４１、５９、及び８３によって標的とされるものから選択される、または配列番号１～１５によって標的とされるゲノム座標から選択される、または配列番号１～１１によって標的とされるゲノム座標から選択される、または配列番号１～４によって標的とされるゲノム座標から選択される、または配列番号１、４、５または９によって標的とされるゲノム座標内の染色体位置に指向するガイド配列を含む、ＬＡＧ３ガイドＲＮＡ。
【請求項３３】
前記ガイドＲＮＡが、単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である、請求項３１または３２に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項３４】
前記ガイド配列に対して３’に配列番号２０１のヌクレオチド配列をさらに含み、前記ガイドＲＮＡが、５’末端修飾または３’末端修飾を含む、請求項３３に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項３５】
５’末端修飾または３’末端修飾及びｇＲＮＡの保存部分をさらに含み、前記保存部分が、
Ａ．配列番号２０１に対して、短縮されたヘアピン１領域、または置換されかつ任意選択で短縮されたヘアピン１領域であって、
１．以下のヌクレオチド対：Ｈ１－１及びＨ１－１２、Ｈ１－２及びＨ１－１１、Ｈ１－３及びＨ１－１０、またはＨ１－４及びＨ１－９のうちの少なくとも１つが、前記置換されかつ任意選択で短縮されたヘアピン１においてワトソン－クリック対形成ヌクレオチ

ドで置換されており、前記ヘアピン１領域が、任意選択で、
ａ．Ｈ１－５～Ｈ１－８のうちのいずれか１つもしくは２つ、
ｂ．以下のヌクレオチド対：Ｈ１－１及びＨ１－１２、Ｈ１－２及びＨ１－１１、Ｈ１－３及びＨ１－１０、ならびにＨ１－４及びＨ１－９のうちの１つ、２つ、もしくは３つ、または
ｃ．ヘアピン１領域の１～８個のヌクレオチドを欠いているか、あるいは
２．前記短縮されたヘアピン１領域が、４～８個のヌクレオチド、好ましくは４～６個のヌクレオチドを欠いており、
ａ．位置Ｈ１－１、Ｈ１－２、もしくはＨ１－３のうちの１つ以上が、配列番号２０１に対して欠失もしくは置換されているか、または
ｂ．位置Ｈ１－６～Ｈ１－１０のうちの１つ以上が、配列番号２０１に対して置換されているか、または
３．前記短縮されたヘアピン１領域が、５～１０個のヌクレオチド、好ましくは５～６個のヌクレオチドを欠いており、位置Ｎ１８、Ｈ１－１２、もしくはｎのうちの１つ以上が、配列番号２０１に対して置換されている、前記ヘアピン１領域、あるいは
Ｂ．短縮された上部ステム領域であって、前記短縮された上部ステム領域が、１～６個のヌクレオチドを欠いており、前記短縮された上部ステム領域の６、７、８、９、１０、または１１個のヌクレオチドが、配列番号２０１に対して４個以下の置換を含む、前記短縮された上部ステム領域、あるいは
Ｃ．ＬＳ６、ＬＳ７、ＵＳ３、ＵＳ１０、Ｂ３、Ｎ７、Ｎ１５、Ｎ１７、Ｈ２－２、及びＨ２－１４のうちのいずれか１つ以上における配列番号２０１に対する置換であって、置換基ヌクレオチドが、アデニンが後に続くピリミジンでもなく、ピリミジンが前に存在するアデニンでもない、前記置換、あるいは
Ｄ．上部ステム領域であって、前記上部ステムの修飾が、配列番号２０１に対して前記上部ステム領域におけるＵＳ１～ＵＳ１２のうちのいずれか１つ以上の修飾を含む、前記上部ステム領域のうちの１つ以上を含む、請求項３３に記載のガイドＲＮＡ。

【請求項３６】

前記ガイドＲＮＡが、ｍＮ＊ｍＮ＊ｍＮ＊ＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＧＵＵＵＵＡＧＡｍＧｍＣｍＵｍＡｍＧｍＡｍＡｍＡｍＵｍＡｍＧｍＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡｍＡｍＣｍＵｍＵｍＧｍＡｍＡｍＡｍＡｍＡｍＧｍＵｍＧｍＧｍＣｍＡｍＣｍＣｍＧｍＡｍＧｍＵｍＣｍＧｍＧｍＵｍＧｍＣｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵ（配列番号３００）パターンに従って修飾され、「Ｎ」が、任意の天然または非天然のヌクレオチドであってよく、ｍが、２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドであり、＊が、ヌクレオチド残基間のホスホロチオエート連結であり、前記Ｎが、集合的に任意の先行請求項に記載のガイド配列のヌクレオチド配列であり、任意選択で、各Ｎが、独立して、任意の天然または非天然のヌクレオチドであり、前記ガイド配列が、前記ＬＡＧ３遺伝子に対してＣａｓ９を標的とする、請求項３３または３４に記載のガイドＲＮＡ。

【請求項３７】

前記ガイドＲＮＡが、修飾を含む、請求項３３～３６のいずれか１項に記載のガイドＲＮＡ。

【請求項３８】

前記修飾が、（１）２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチド、（ｉｉ）２’－Ｆ修飾ヌクレオチド、（ｉｉｉ）ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）結合、（ｉｖ）前記ガイドＲＮＡの５’末端にある最初の５個のヌクレオチドのうちの１つ以上での修飾、（ｖ）前記ガイドＲＮＡの３’末端にある最後の５個のヌクレオチドのうちの１つ以上での修飾、（ｖｉ）前記ガイドＲＮＡの最初の４個のヌクレオチドの各々の間のＰＳ結合、（ｖｉｉ）前記ガイドＲＮＡの最後の４個のヌクレオチドの各々の間のＰＳ結合、（ｖｉｉｉ）前記ガイドＲＮＡの前記５’末端にある最初の３個のヌクレオチドの各々での２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド、（ｉｘ）前記ガイドＲＮＡの前記３’末端にある最後の３個のヌクレオチドの各々での２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド、または（ｉ）

～（ｉｘ）のうちの１つ以上の組み合わせを含む、請求項３７に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項３９】
請求項３１～３８のいずれか１項に記載のガイドＲＮＡ、及びＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含む組成物であって、前記ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、ポリペプチドＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、またはＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤ポリペプチドをコードする核酸であり、任意選択で、前記ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、Ｃａｓ９ヌクレアーゼである、前記組成物。
【請求項４０】
前記組成物が、薬学的に許容される賦形剤をさらに含む、請求項３１～３８のいずれか１項に記載のガイドＲＮＡ、または請求項３９に記載の組成物。
【請求項４１】
前記ガイドＲＮＡが、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と会合している、請求項３１～４０のいずれか１項に記載のガイドＲＮＡまたは組成物。
【請求項４２】
細胞内のＬＡＧ３配列において遺伝子修飾を行う方法であって、前記細胞を、請求項３１～４１のいずれか１項に記載のガイドＲＮＡまたは組成物と接触させることを含む、前記方法。
【請求項４３】
ＴＣＲ配列においてＴＣＲ遺伝子の発現を阻害するための遺伝子修飾を行うことをさらに含む、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
免疫療法のための細胞集団を調製する方法であって、
ａ．ＬＡＧ３ガイドＲＮＡまたは請求項３１～４１のいずれか１項に記載の組成物を有する集団内の細胞中のＬＡＧ３配列において遺伝子修飾を行うことと、
ｂ．前記集団の前記細胞中のＴＣＲ配列において遺伝子修飾を行い、前記集団内の前記細胞の前記表面上の前記ＴＣＲタンパク質の発現を低減することと、
ｃ．培養物中の前記細胞集団を増殖することと、を含む、前記方法。
【請求項４５】
請求項４２～４４のいずれか１項に記載の方法によって作製される、細胞集団。
【請求項４６】
前記細胞集団が、エクスビボで改変される、請求項４５に記載の細胞集団。
【請求項４７】
請求項４５または４６に記載の細胞集団を必要とする対象に投与する方法。
【請求項４８】
請求項４５または４６に記載の集団を、養子細胞移植（ＡＣＴ）療法として対象に投与する、方法。
【請求項４９】
ＡＣＴ療法として使用するための、請求項４５または４６に記載の細胞集団。
【請求項５０】
ＬＡＧ３遺伝子の遺伝子修飾を含む細胞集団であって、前記集団内の細胞の少なくとも４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、好ましくは少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、または９５％が、内因性ＬＡＧ３配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む、前記細胞集団。
【請求項５１】
ＬＡＧ３の発現が、例えば、前記ＬＡＧ３遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、好ましくは少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、もしくは９５％、または前記アッセイの検出限界未満まで減少する、請求項５０に記載の細胞集団。
【請求項５２】
前記集団内の細胞の少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、または

少なくとも９５％が、前記内因性ＬＡＧ３配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む、請求項５０または５１に記載の細胞集団。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【０００１】

本出願は、２０２１年２月８日に出願された米国仮出願第６３／１４７，２２３号の３５　Ｕ．Ｓ．Ｃ．１１９（ｅ）に基づく利益を主張し、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０００２】

本出願は、電子形式の配列表とともに出願される。配列表は、２０２２年１月３１日に作成された「０１１５５－００４０－００ＰＣＴ＿Ｓｅｑ＿Ｌｉｓｔ＿ＳＴ２５．ｔｘｔ」と題するファイルとして提供され、サイズは１２９，０２４バイトである。配列表の電子形式の情報は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０００３】

緒言及び概要

Ｔ細胞疲弊は、慢性抗原刺激に対するＴ細胞の応答を説明するために使用されてきた広義の用語である。これは、慢性ウイルス感染の設定において最初に観察されたが、腫瘍に対する免疫応答においても研究されてきた。Ｔ細胞疲弊機序の特性及び特徴は、チェックポイント遮断及び養子Ｔ細胞移植療法の成功に決定的な意味を有し得る。

【０００４】

Ｔ細胞疲弊は、慢性感染症及びがんの特徴である、長期の抗原刺激によるエフェクター機能の進行性の喪失である。連続的な抗原刺激に加えて、微小環境に存在する抗原提示細胞及びサイトカインもまた、この疲弊した表現型に寄与し得る。したがって、Ｔ細胞疲弊は、Ｔ細胞のエフェクター機能が低下し、阻害性受容体の発現が持続するＴ細胞機能不全の状態である。これにより、感染症または腫瘍の最適な制御が妨げられる。さらに、疲弊したＴ細胞は、機能性エフェクターまたはメモリーＴ細胞の転写状態とは異なる転写状態を有する。治療的処置は、疲弊したＴ細胞を救出する可能性を有する（Ｇｏｌｄｂｅｒｇ，Ｍ．Ｖ．＆Ｄｒａｋｅ，Ｃ．Ｇ．，２０１１，Ｗｈｅｒｒｙ，Ｅ．Ｊ．＆Ｋｕｒａｃｈｉ　Ｍ．，２０１５）。

【０００５】

疲弊したＴ細胞は、典型的には、プログラム細胞死１（ＰＤＣＤ１またはＰＤ－１）などの共阻害性受容体を発現する。遺伝子産物は、免疫チェックポイント系の構成要素として作用する。Ｔ細胞疲弊は、これらの受容体を遮断することによって逆転され得る。

【０００６】

ＬＡＧ３リンパ球活性化遺伝子－３（ＬＡＧ３）は、免疫グロブリン（Ｉｇ）スーパーファミリーの一部である（Ｔｒｅｉｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，　１９９０）。ＬＡＧ３は、活性化ＣＤ４$^{+}$及びＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、Ｂ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、及び樹状細胞（ＤＣ）に発現する細胞表面タンパク質である。ＬＡＧ３は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の細胞膜にも発現している。ＬＡＧ３は、Ｔ細胞の免疫チェックポイントとして作用し、負の調節機能を有することが示されている。慢性感染の間に、Ｔ細胞はＬＡＧ３を発現する、ならびに、Ｔ細胞の免疫応答を下方制御する他の免疫チェックポイント遺伝子も発現する。ＬＡＧ３が、Ｔ細胞応答を下方制御するメカニズムは明らかではない。しかし、ＭＨＣ　ＩＩのＬＡＧ３への結合による阻害効果は、ＬＡＧ３の細胞内ＫＩＥＥＬＥドメインに依存している。

【０００７】

例えば、例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系を使用して生成されたＬＡＧ３配列、例えば、ゲノム遺伝子座における遺伝子修飾（例えば、挿入、欠失、置換）を有する細胞の調製方法において、使用するための化合物及び組成物、ならびにＬＡＧ３配列における遺伝子修飾を有する細胞、及び例えば、免疫腫瘍学及び感染症における、例えば、免疫応答を促進するための様々な方法におけるそれらの使用を本明細書に提供する。ＬＡＧ３発現を低

減し得るＬＡＧ３遺伝子修飾を有する細胞は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）遺伝子座、例えば、ＴＲＡＣまたはＴＲＢＣ遺伝子座；ＭＨＣクラスＩ分子、例えば、Ｂ２Ｍ及びＨＬＡ－Ａ遺伝子座の発現を低減するゲノム遺伝子座；ＭＨＣクラスＩＩ分子、例えば、ＣＩＩＴＡ遺伝子座の発現を低減するゲノム遺伝子座；ならびにチェックポイント阻害剤遺伝子座、例えば、ＣＤ２４４（２Ｂ４）遺伝子座、ＴＩＭ３遺伝子座、及びＰＤ－１遺伝子座を含む追加のゲノム配列における遺伝子修飾を含み得る。本開示は、ＬＡＧ３配列の遺伝子修飾を有する細胞、及び任意選択で本明細書に提供される他のゲノム遺伝子座を含む細胞集団に関する。細胞は、養子Ｔ細胞移植療法において使用されてもよい。本開示は、治療、例えば、がん治療及び免疫療法で使用するためのＬＡＧ３配列の遺伝子修飾を伴う細胞の組成物及び使用に関する。本開示は、ｇＲＮＡ分子、ＣＲＩＳＰＲ系、細胞、及び細胞のゲノム編集に有用な方法に関する。

【０００８】

ｃｈｒ１２：６７７２４８３－６７７８４５５のゲノム座標内に、ヒトＬＡＧ３配列における遺伝子修飾を含む、操作された細胞が本明細書に提供される。さらなる実施形態が、特許請求の範囲及び図面全体を通して提供され、記載される。

【０００９】

対象を治療するための医薬の調製のための、上記実施形態のいずれかに記載の組成物または製剤の使用も開示される。対象は、ヒトまたは動物（例えば、ヒトまたは非ヒト動物、例えば、カニクイザル）であってもよい。好ましくは、対象は、ヒトである。

【００１０】

ＬＡＧ３遺伝子配列に遺伝子修飾（例えば、挿入、置換、または欠失）をもたらす際に使用するための、上記組成物または製剤のうちのいずれかも開示される。特定の実施形態では、配列内の遺伝子修飾は、ゲノム遺伝子座の遺伝子修飾の前に、例えば、フレームシフトまたはナンセンス変異を形成することによって、全長タンパク質の翻訳を防止する核酸配列の変化をもたらし、その結果、翻訳は早期に終結する。遺伝子修飾は、スプライス部位、すなわち、スプライスアクセプター部位またはスプライスドナー部位における挿入、置換、または欠失を含むことができ、その結果、異常なスプライシングは、フレームシフト変異、ナンセンス変異、または切断されたｍＲＮＡをもたらし、その結果、翻訳は早期に終結する。遺伝子修飾はまた、コードされたタンパク質の翻訳または折り畳みを妨害し、早期の翻訳終結をもたらす可能性がある。

【００１１】

配列内の遺伝子修飾の生成に使用するために本明細書で提供される組成物は、好ましくは、配列からのタンパク質の発現、例えば、タンパク質の細胞表面発現の低減をもたらす。

【００１２】

別の態様では、本発明は、対象に免疫療法を提供する方法であって、本明細書に記載される有効量の細胞、例えば、前述の細胞態様及び実施形態のうちのいずれかの細胞を対象に投与することを含む、方法を提供する。

【００１３】

方法の実施形態では、方法は、本明細書に記載される細胞または細胞集団を投与する前のリンパ枯渇を含む。方法の実施形態では、方法は、本明細書に記載される有効量の細胞、例えば、前述の細胞態様及び実施形態のうちのいずれかの細胞を対象に投与する前に、リンパ消耗剤または免疫抑制剤を投与することを含む。別の態様では、本発明は、細胞（例えば、細胞集団）を調製する方法を提供する。

【００１４】

免疫療法は、免疫系を活性化または抑制することによる疾患の治療である。免疫応答を誘発または増幅するように設計された免疫療法は、活性化免疫療法として分類される。細胞ベースの免疫療法は、いくつかのがんの治療に有効であることが実証されている。リンパ球、マクロファージ、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞（ＮＫ細胞）、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）などの免疫エフェクター細胞は、腫瘍細胞の表面に発現する異常な抗原

に応答して作用するようにプログラムすることができる。したがって、がん免疫療法は、免疫系の成分が腫瘍または他のがん細胞を破壊するのを可能にする。

【００１５】

免疫療法はまた、慢性感染症、例えば、Ｂ型肝炎及びＣ型肝炎ウイルス感染症、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）感染症、結核感染症、ならびにマラリア感染症の治療に有用であり得る。トランスジェニックＴＣＲまたはＣＡＲなどの標的化受容体を含む免疫エフェクター細胞は、本明細書に記載されるものなどの免疫療法において有用である。

【００１６】

別の態様では、本発明は、免疫療法のための細胞（例えば、細胞集団）を調製する方法であって、（ａ）例えば、本明細書に開示されるｇＲＮＡ分子（本明細書に記載される）、または２つ以上のｇＲＮＡ分子を当該細胞に導入することによって、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）の１つ以上または全ての構成要素の発現を低減または排除することによって細胞を修飾することと、（ｂ）当該細胞を増殖することと、を含む、方法を提供する。本発明の細胞は、例えば、標的化受容体、例えば、ＴＣＲ／ＣＤ３ゼータ鎖シグナル伝達を媒介するポリペプチドをコードする異種配列の導入によるさらなる操作に好適である。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、非内因性ＴＣＲまたはＣＡＲ配列から選択される標的化受容体である。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、野生型またはバリアントＴＣＲである。本発明の細胞はまた、代替の抗原結合部分をコードする異種配列の導入、例えば、代替の（非内因性）Ｔ細胞受容体、例えば、特定のタンパク質を標的とするように操作されたキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする異種配列の導入による、さらなる操作にも好適であり得る。ＣＡＲは、キメラ免疫受容体、キメラＴ細胞受容体または人工Ｔ細胞受容体としても知られている。

【００１７】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の細胞を調製する方法、例えば、細胞を調製する方法の前述の態様及び実施形態のうちのいずれかの方法によって調製された細胞（例えば、細胞集団）を投与することを含む、対象を治療する方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【００１８】

【図１】次世代（ＮＧＳ）シークエンシングによって測定した、４人のドナー（「０１８」、「１００」、「３１５」及び「７９７」）の各々からの試料の編集の程度を示す。

【図２Ａ】フローサイトメトリーによって測定した、再刺激Ｔ細胞におけるＬＡＧ３タンパク質発現の程度を示す。ｙ軸は、ＬＡＧ３陽性細胞のパーセンテージを示し、誤差バーは、この測定のＳＤ（ＳＤ）を示す。ドナー「０１８」及び「１００」に由来する試料の結果を示す。

【図２Ｂ】フローサイトメトリーによって測定した、再刺激Ｔ細胞におけるＬＡＧ３タンパク質発現の程度を示す。ｙ軸は、ＬＡＧ３陽性細胞のパーセンテージを示し、誤差バーは、この測定のＳＤ（ＳＤ）を示す。ドナー「３１５」及び「７９７」に由来する試料の結果を示す。

【図３Ａ】ＮＧＳシークエンシングによって測定した、再刺激したＴ細胞中の編集の程度を示す。

【図３Ｂ】フローサイトメトリーによって測定した、ＬＡＧ３＋細胞のパーセントを示し、誤差バーは、この測定のＳＤを示す。

【図４】Ｔ細胞におけるＬＡＧ３ガイドＲＮＡによる編集の用量応答曲線を示す。

【図５Ａ】ＣＤ８＋ＷＴ１　ＴＣＲ発現操作された細胞の中の幹細胞メモリーＴ細胞（Ｔｓｃｍ）を示す。

【図５Ｂ】ＣＤ８＋ＷＴ１　ＴＣＲ発現操作された細胞の中の中央メモリーＴ細胞（Ｔｃｍ）を示す。

【図５Ｃ】ＣＤ８＋ＷＴ１　ＴＣＲ発現操作された細胞の中のエフェクターメモリーＴ細胞（Ｔｅｍ）を示す。

【図６Ａ】操作されたＴ細胞における第３の連続編集のためにＮＧＳを介して設定された

第１のプライマーで決定されたインデル頻度を示す。
【図６Ｂ】操作されたＴ細胞における第３の連続編集のためにＮＧＳを介して設定された第２の異なるプライマーで決定されたインデル頻度を示す。
【図７Ａ】ＷＴ１を発現するＡＭＬ細胞を操作されたＴ細胞に曝露した後の、赤色及び緑色の両方で蛍光を発する平均画像面積を示す。Ａ、Ｂ、及びＣは、それぞれ、ＡＭＬ細胞株ｐＡＭＬ１、ｐＡＭＬ２、またはｐＡＭＬ３で５：１のＥ：Ｔを使用したアッセイを示す。
【図７Ｂ】ＷＴ１を発現するＡＭＬ細胞を操作されたＴ細胞に曝露した後の、赤色及び緑色の両方で蛍光を発する平均画像面積を示す。Ａ、Ｂ、及びＣは、それぞれ、ＡＭＬ細胞株ｐＡＭＬ１、ｐＡＭＬ２、またはｐＡＭＬ３で５：１のＥ：Ｔを使用したアッセイを示す。
【図７Ｃ】ＷＴ１を発現するＡＭＬ細胞を操作されたＴ細胞に曝露した後の、赤色及び緑色の両方で蛍光を発する平均画像面積を示す。Ａ、Ｂ、及びＣは、それぞれ、ＡＭＬ細胞株ｐＡＭＬ１、ｐＡＭＬ２、またはｐＡＭＬ３で５：１のＥ：Ｔを使用したアッセイを示す。
【図７Ｄ】ＷＴ１を発現するＡＭＬ細胞を操作されたＴ細胞に曝露した後の、赤色及び緑色の両方で蛍光を発する平均画像面積を示す。Ｄ、Ｅ、及びＦは、それぞれ、ＡＭＬ細胞株ｐＡＭＬ１、ｐＡＭＬ２、またはｐＡＭＬ３で１：１のＥ：Ｔを使用したアッセイを示す。
【図７Ｅ】ＷＴ１を発現するＡＭＬ細胞を操作されたＴ細胞に曝露した後の、赤色及び緑色の両方で蛍光を発する平均画像面積を示す。Ｄ、Ｅ、及びＦは、それぞれ、ＡＭＬ細胞株ｐＡＭＬ１、ｐＡＭＬ２、またはｐＡＭＬ３で１：１のＥ：Ｔを使用したアッセイを示す。
【図７Ｆ】ＷＴ１を発現するＡＭＬ細胞を操作されたＴ細胞に曝露した後の、赤色及び緑色の両方で蛍光を発する平均画像面積を示す。Ｄ、Ｅ、及びＦは、それぞれ、ＡＭＬ細胞株ｐＡＭＬ１、ｐＡＭＬ２、またはｐＡＭＬ３で１：１のＥ：Ｔを使用したアッセイを示す。
【図７Ｇ】ＷＴ１を発現するＡＭＬ細胞を操作されたＴ細胞に曝露した後の、赤色及び緑色の両方で蛍光を発する平均画像面積を示す。Ｇ、Ｆ、及びＩは、それぞれ、ＡＭＬ細胞株ｐＡＭＬ１、ｐＡＭＬ２、またはｐＡＭＬ３で１：５のＥ：Ｔを使用したアッセイを示す。
【図７Ｈ】ＷＴ１を発現するＡＭＬ細胞を操作されたＴ細胞に曝露した後の、赤色及び緑色の両方で蛍光を発する平均画像面積を示す。Ｇ、Ｆ、及びＩは、それぞれ、ＡＭＬ細胞株ｐＡＭＬ１、ｐＡＭＬ２、またはｐＡＭＬ３で１：５のＥ：Ｔを使用したアッセイを示す。
【図７Ｉ】ＷＴ１を発現するＡＭＬ細胞を操作されたＴ細胞に曝露した後の、赤色及び緑色の両方で蛍光を発する平均画像面積を示す。Ｇ、Ｆ、及びＩは、それぞれ、ＡＭＬ細胞株ｐＡＭＬ１、ｐＡＭＬ２、またはｐＡＭＬ３で１：５のＥ：Ｔを使用したアッセイを示す。
【発明を実施するための形態】
【００１９】
ここで、本発明の特定の実施形態を詳細に参照し、本発明の実施形態の例は添付の図面で例示される。本教示を様々な実施形態と併せて記載するが、本教示をそれらの実施形態に限定することを意図するものではない。逆に、本教示は、当業者によって理解されるように、様々な代替、改変物、及び均等物を包含する。
【００２０】
本教示を詳細に説明する前に、本開示は、特定の組成物またはプロセスステップに限定されるものではなく、したがって変化し得ると理解されるべきである。本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用されるように、単数形「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、文脈が別途明確に指示しない限り、複数の参照物を含めることに留意されたい。したがって

、例えば、「コンジュゲート（ａ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅ）」への言及は、複数のコンジュゲートを含み、「細胞（ａ　ｃｅｌｌ）」への言及は、複数の細胞（例えば、細胞集団）を含む等である。

【００２１】

数値範囲には、その範囲を定義する数値が含まれる。測定値及び測定可能な値は、有意な桁及び測定に関連する誤差を考慮して、おおよその値であると理解される。いくつかの実施形態では、細胞集団は、少なくとも10^3、10^4、10^5、または10^6個の細胞、好ましくは10^7、2×10^7、5×10^7、または10^8個の細胞の集団を指す。

【００２２】

「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「含有する（ｃｏｎｔａｉｎ）」、「含有する（ｃｏｎｔａｉｎｓ）」、「含有する（ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」、及び「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」の使用は、限定することを意図するものではない。上述の概略的な説明と、以下の詳細な説明はいずれも例示であり、単に説明するためのものであり、その教示を限定するものではないことが理解されるべきである。本明細書に特に記載されていない限り、様々な構成要素を「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」と列挙する本明細書の実施形態はまた、その列挙された構成要素「からなる」か、またはそれら「から本質的になる」ものであると想定される。様々な構成要素「からなる」と列挙する本明細書の実施形態はまた、その列挙された構成要素を「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」か、またはそれら「から本質的になる」ものであると想定される。様々な構成要素「から本質的になる」と列挙する本明細書の実施形態はまた、その列挙された構成要素「からなる」か、またはそれらを「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」ものであると想定される（この互換性は、特許請求の範囲におけるこれらの用語の使用には適用されない）。

【００２３】

「または」という用語は、文脈が別途明確に示さない限り、明細書において包括的な意味で、すなわち、「及び／または」に等しい意味で使用される。

【００２４】

「約」という用語は、リストの前に使用されると、リストの各メンバーを修飾する。「約」という用語は、当該技術分野内の許容される変動または誤差、例えば、平均からの２ＳＤ、または測定を行うために使用される方法の感度を包含すると理解される。「約」が数列の第１の値の前に存在するとき、数列の各値を修飾することが理解され得る。

【００２５】

範囲は、その範囲の最後の数値及びその間の全ての論理値を含むと理解される。例えば、５～１０個のヌクレオチドは、５、６、７、８、９、または１０個のヌクレオチドとして理解され、５～１０％は、５％及び１０％までの全ての可能な値を含有すると理解される。

【００２６】

２０ヌクレオチド配列の少なくとも１７個のヌクレオチドは、提供される配列の１７、１８、１９、または２０個ヌクレオチドを含むと理解され、したがって明確に理解されるため、１つが特異的に提供されなくても上限を提供する。同様に、最大３個のヌクレオチドは、０、１、２、または３個のヌクレオチドを包含すると理解され、１つが特異的に提供されなくても下限を提供する。「少なくとも」、「最大」、または他の同様の言語が数字を修飾するとき、数列の各数字を修飾することが理解され得る。

【００２７】

本明細書で使用される場合、「それ以下」または「それ未満」は、語句に隣接する値、及び文脈から論理的であるように、ゼロまでの論理的により低い値または整数として理解される。例えば、「２個以下のヌクレオチド塩基対」の二重鎖領域は、２、１、または０個のヌクレオチド塩基対を有する。一連の数字または範囲の前に「以下」または「未満」が存在する場合、一連または範囲内の数字の各々が修飾されることを理解されたい。

【００２８】
本明細書で使用される場合、範囲は、上限及び下限の両方を含む。
【００２９】
本出願における配列と、指示された受入番号または受入番号における位置との間に矛盾が生じた場合、本出願における配列が優勢である。
【００３０】
化学名と構造との間に矛盾がある場合、構造が優勢である。
【００３１】
本明細書で使用される場合、「分析物を検出する」等は、存在する場合、分析物を検出することができるアッセイを実施することとして理解され、分析物は、アッセイの検出レベルを上回る量で存在する。
【００３２】
本明細書で使用される場合、値の最大量が１００％（例えば、１００％阻害または１００％カプセル化）で表される場合、値は検出方法によって制限されることが理解される。例えば、１００％阻害は、アッセイの検出レベルを下回るレベルへの阻害として理解され、１００％カプセル化は、カプセル化のために意図された材料を小胞の外側で検出することができないとして理解される。
【００３３】
本明細書に使用される節の見出しは、構成目的のものに過ぎず、決して所望の主題を限定すると解釈されるべきではない。参照により組み込まれる任意の材料が、本明細書で定義される任意の用語または本明細書の任意の他の明示的な内容と矛盾する場合、本明細書が優先する。
【００３４】
Ｉ．定義
特に明記しない限り、本明細書で使用される以下の用語及び句は、以下の意味を有することを意図する。
【００３５】
「ポリヌクレオチド」及び「核酸」は、骨格に沿って一緒に連結された窒素系複素環式塩基または塩基類似体を有するヌクレオシドまたはヌクレオシド類似体（従来のＲＮＡ、ＤＮＡ、混合ＲＮＡ－ＤＮＡ、及びそれらの類似体であるポリマーを含む）を含む、多量体化合物を指すために本明細書で使用される。核酸「骨格」は、糖ホスホジエステル連結、ペプチド－核酸結合（「ペプチド核酸」またはＰＮＡ、ＰＣＴ第９５／３２３０５号）、ホスホロチオエート連結、メチルホスホネート連結、またはそれらの組み合わせのうちの１つ以上を含む、様々な連結から構成され得る。核酸の糖部分は、リボース、デオキシリボース、または置換、例えば、２’メトキシまたは２’ハロゲン化物置換を有する類似の化合物であり得る。ＲＮＡは、例えば、修飾として、１つ以上のデオキシリボースヌクレオチドを含み得、同様に、ＤＮＡは、１つ以上のリボヌクレオチドを含み得る。窒素系塩基は、従来の塩基（Ａ、Ｇ、Ｃ、Ｔ、Ｕ）、その類似体（例えば、５－メトキシウリジン、シュードウリジン、もしくはＮ１－メチルシュードウリジンなどの修飾ウリジン）；イノシン；プリンもしくはピリミジンの誘導体（例えば、N^4－メチルデオキシグアノシン、デアザ－もしくはアザ－プリン、デアザ－もしくはアザ－ピリミジン、５位もしくは６位に置換基を有するピリミジン塩基（例えば、５－メチルシトシン）、２、６、もしくは８位に置換基を有するプリン塩基、２－アミノ－６－メチルアミノプリン、O^6－メチルグアニン、４－チオ－ピリミジン、４－アミノ－ピリミジン、４－ジメチルヒドラジン－ピリミジン、及びO^4－アルキル－ピリミジン；米国特許第５，３７８，８２５号及びＰＣＴ第ＷＯ９３／１３１２１号）であってもよい。一般的な考察については、Ｔｈｅ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ ｔｈｅ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ ５－３６、Ａｄａｍｓ ｅｔ ａｌ．編集、第１１版、１９９２を参照）。核酸は、骨格がポリマーの位置（複数可）に窒素系塩基を含まない１つ以上の「脱塩基」残基を含み得る（米国特許第５，５８５，４８１号）。核酸は、従来のＲＮＡもしくはＤＮＡ糖、塩基及び連結のみを

含むことができるか、または従来の構成要素及び置換の両方（例えば、２’メトキシ置換基を有する従来のヌクレオシド、または従来のヌクレオシド及び１つ以上のヌクレオシド類似体の両方を含有するポリマー）を含むことができる。核酸は、ＲＮＡ模倣糖構造にロックされた二環式フラノース単位を有し、相補的なＲＮＡ及びＤＮＡ配列に対するハイブリダイゼーション親和性を高める、１つ以上のＬＮＡヌクレオチドモノマーを含有する類似体である「ロックド核酸」（ＬＮＡ）を含む（Ｖｅｓｔｅｒ ａｎｄ Ｗｅｎｇｅｌ，２００４，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ４３（４２）：１３２３３－４１）。ＲＮＡ及びＤＮＡは異なる糖部分を有し、ＲＮＡ内のウラシルもしくはその類似体及びＤＮＡ内のチミンもしくはその類似体の存在によって異なり得る。

【００３６】

「ガイドＲＮＡ」、「ｇＲＮＡ」、及び単に「ガイド」は、例えば、単一ガイドＲＮＡ、またはｃｒＲＮＡ及びｔｒＲＮＡの組み合わせ（ｔｒａｃｒＲＮＡとしても知られる）のいずれかを指すために、本明細書で互換的に使用される。ｃｒＲＮＡ及びｔｒＲＮＡは、単一ＲＮＡ分子（単一ガイドＲＮＡ、ｓｇＲＮＡ）として会合し得るか、または、２つの別々のＲＮＡ鎖（デュアルガイドＲＮＡ、ｄｇＲＮＡ）において会合し得る。「ガイドＲＮＡ」または「ｇＲＮＡ」は、各々のタイプを指す。ｔｒＲＮＡは、天然に存在する配列、または修飾もしくは変化を伴うｔｒＲＮＡ配列であり得る。

【００３７】

本明細書で使用される場合、「ガイド配列」は、標的配列に対して相補的であり、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤による結合または修飾（例えば、切断）のための標的配列に対してガイドＲＮＡを指向させるように機能する、ガイドＲＮＡ内の配列を指す。「ガイド配列」は、「標的化配列」または「スペーサー配列」とも称され得る。ガイド配列は、例えば、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ（すなわち、Ｓｐｙ Ｃａｓ９）及び関連するＣａｓ９ホモログ／オルソログの場合、２０塩基対の長さであり得る。例えば、１５、１６、１７、１８、１９、２１、２２、２３、２４、または２５ヌクレオチド長のような、より短い配列またはより長い配列もまたガイドとして使用できる。例えば、いくつかの実施形態では、ガイド配列は、配列番号１～８８から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、標的配列は、例えば、遺伝子内または染色体上にあり、例えば、ガイド配列に対して相補的である。いくつかの実施形態において、ガイド配列とそれに対応する標的配列との間の相補性または同一性の程度は、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、もしくは９５％であるか、または１００％である。例えば、いくつかの実施形態では、ガイド配列は、配列番号１～８８から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、または９５％、または１００％の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイド配列及び標的領域は、１００％相補的または同一であり得る。他の実施形態では、ガイド配列及び標的領域とは、参照配列に応じて、少なくとも１個のミスマッチ、すなわち、同一ではないか、または相補的ではない１個のヌクレオチドを含有していてもよい。例えば、ガイド配列及び標的配列は、１、２、３、または４個のミスマッチを含有していてもよく、標的配列の全長は、１７、１８、１９、２０個、またはそれ以上のヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ガイド配列及び標的領域は、１～４個のミスマッチを含有していてもよく、ガイド配列は、少なくとも１７、１８、１９、２０個、またはそれ以上のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ガイド配列及び標的領域は、１、２、３、または４個のミスマッチを含有していてもよく、ガイド配列は、２０個のヌクレオチドを含む。すなわち、ガイド配列及び標的領域は、１７、１８、１９、２０個、またはそれ以上の塩基対を有する二重鎖領域を形成してもよい。特定の実施形態では、二重鎖領域は、１、２、３、または４個のミスマッチを含んでもよく、その結果、ガイド鎖及び標的配列は完全に相補的ではない。例えば、ガイド鎖及び標的配列は、２個のミスマッチを含む、２０を超えるヌクレオチド領域にわたって相補的であってもよく、その結果、ガイド配列及び標的配列は、９０％相補的であり、２０個のうち１８個の塩基対の二重鎖領域を

提供する。

【００３８】

ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の核酸基質は二本鎖核酸であるため、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の標的配列は、ゲノムＤＮＡのプラス鎖とマイナス鎖（すなわち、与えられる配列と、配列の逆相補体）の両方を含む。したがって、ガイド配列が、「標的配列に対して相補的」であると言われる場合、標的配列のセンス鎖またはアンチセンス鎖に結合するようにガイドＲＮＡを指向させ得ると理解されるべきである。したがって、いくつかの実施形態では、ガイド配列が標的配列の逆相補体に結合する場合、ガイド配列は、ガイド配列におけるＵのＴへの置換を除いて、標的配列の特定のヌクレオチド（例えば、ＰＡＭを含まない標的配列）と同一である。

【００３９】

本明細書で使用される場合、「ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤」は、ＲＮＡ及びＤＮＡ結合活性を有するポリペプチドもしくはポリペプチドの複合体、またはそのような複合体のＤＮＡ結合サブユニットを意味し、ＤＮＡ結合活性は、配列特異的であり、ＲＮＡの配列に依存する。例示的なＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤には、Ｃａｓクリベース（ｃｌｅａｖａｓｅ）／ニッカーゼ及びその不活性化形態（ｄＣａｓ　ＤＮＡ結合剤」）が含まれる。本明細書で使用されるとき、「Ｃａｓヌクレアーゼ」は、Ｃａｓクリベース、Ｃａｓニッカーゼ、及びｄＣａｓ　ＤＮＡ結合剤を包含する。ｄＣａｓ　ＤＮＡ結合剤は、非機能性ヌクレアーゼドメイン（ＲｕｖＣまたはＨＮＨドメイン）を含む不活性型ヌクレアーゼであり得る。いくつかの実施形態では、Ｃａｓクリベースまたは Ｃａｓニッカーゼは、例えば、ＦｏｋＩドメインとの融合を介して、ＤＮＡ切断を可能にするように修飾されたｄＣａｓ ＤＮＡ結合剤を包含する。Ｃａｓクリベース／ニッカーゼ及びｄＣａｓ　ＤＮＡ結合剤には、ＩＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステムのＣｓｍまたはＣｍｒ複合体、そのＣａｓ１０、Ｃｓｍ１、またはＣｍｒ２サブユニット、Ｉ型ＣＲＩＳＰＲ系のカスケード複合体、そのＣａｓ３サブユニット、及びクラス２　Ｃａｓヌクレアーゼが含まれる。本明細書で使用される場合、「クラス２　Ｃａｓヌクレアーゼ」は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合活性を有する一本鎖ポリペプチドである。クラス２　Ｃａｓヌクレアーゼには、さらにＲＮＡガイドＤＮＡクリベースまたはニッカーゼ活性を有するクラス２　Ｃａｓクリベース／ニッカーゼ（例えば、Ｈ８４０Ａ、Ｄ１０Ａ、またはＮ８６３Ａバリアント）、及びクリベース／ニッカーゼ活性が不活性化されている、クラス２　ｄＣａｓ　ＤＮＡ結合剤が含まれる。クラス２　Ｃａｓヌクレアーゼには、例えば、Ｃａｓ９、Ｃｐｆ１、Ｃ２ｃ１、Ｃ２ｃ２、Ｃ２ｃ３、ＨＦ　Ｃａｓ９（例えば、Ｎ４９７Ａ、Ｒ６６１Ａ、Ｑ６９５Ａ、Ｑ９２６Ａバリアント）、ＨｙｐａＣａｓ９（例えば、Ｎ６９２Ａ、Ｍ６９４Ａ、Ｑ６９５Ａ、Ｈ６９８Ａバリアント）、ｅＳＰＣａｓ９（１．０）（例えば、Ｋ８１０Ａ、Ｋ１００３Ａ、Ｒ１０６０Ａバリアント）、及びｅＳＰＣａｓ９（１．１）（例えば、Ｋ８４８Ａ、Ｋ１００３Ａ、Ｒ１０６０Ａバリアント）タンパク質、ならびにそれらの修飾物が含まれる。Ｃｐｆ１タンパク質、Ｚｅｔｓｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ，１６３：１－１３（２０１５）は、Ｃａｓ９と相同であり、ＲｕｖＣ様ヌクレアーゼドメインを含む。ＺｅｔｓｃｈｅのＣｐｆ１配列は、参照によりそれらの全体が組み込まれる。例えば、Ｚｅｔｓｃｈｅの表Ｓ１及びＳ３を参照のこと。例えば、Ｍａｋａｒｏｖａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｒｅｖ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ，１３（１１）：７２２－３６（２０１５）、Ｓｈｍａｋｏｖ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｅｌｌ，６０：３８５－３９７（２０１５）を参照のこと。

【００４０】

Ｃａｓ９分子の例示的なヌクレオチド及びポリペプチド配列を以下に提供する。代替の天然に存在するバリアントを含む、Ｃａｓ９ポリペプチド配列をコードする代替のヌクレオチド配列を同定するための方法は、当該技術分野において既知である。本明細書に提供されるアミノ酸配列をコードするＣａｓ９核酸配列、アミノ酸配列、または核酸配列のうちのいずれかに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有する配列も企図される。

【００４１】

Ｃａｓ９の例示的なオープンリーディングフレーム（配列番号９３）

AUGGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGACAUCGGCACCA
ACUCCGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGAGUACAAGGU
GCCCUCCAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACACCGACCGG
CACUCCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGCGCCCUGCUGUUCG
ACUCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCUGAAGCGGAC
CGCCCGGCGGCGGUACACCCGGCGGAAGAACCGGAUCUGC
UACCUGCAGGAGAUCUUCUCCAACGAGAUGGCCAAGGUGG
ACGACUCCUUCUUCCACCGGCUGGAGGAGUCCUUCCUGGU
GGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCAUCUUCGGC
AACAUCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGUACCCCA
CCAUCUACCACCUGCGGAAGAAGCUGGUGGACUCCACCGA
CAAGGCCGACCUGCGGCUGAUCUACCUGGCCCUGGCCCAC
AUGAUCAAGUUCCGGGGCCACUUCCUGAUCGAGGGCGACC
UGAACCCCGACAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUCAUCCA
GCUGGUGCAGACCUACAACCAGCUGUUCGAGGAGAACCCC
AUCAACGCCUCCGGCGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGUCCG
CCCGGCUGUCCAAGUCCCGGCGGCUGGAGAACCUGAUCGC
CCAGCUGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCUGUUCGGCAAC
CUGAUCGCCCUGUCCCUGGGCCUGACCCCCAACUUCAAGU
CCAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUGCAGCUGUC
CAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCC
CAGAUCGGCGACCAGUACGCCGACCUGUUCCUGGCCGCCA
AGAACCUGUCCGACGCCAUCCUGCUGUCCGACAUCCUGCG
GGUGAACACCGAGAUCACCAAGGCCCCCCUGUCCGCCUCC
AUGAUCAAGCGGUACGACGAGCACCACCAGGACCUGACCC
UGCUGAAGGCCCUGGUGCGGCAGCAGCUGCCCGAGAAGUA
CAAGGAGAUCUUCUUCGACCAGUCCAAGAACGGCUACGCC
GGCUACAUCGACGGCGGCGCCUCCCAGGAGGAGUUCUACA
AGUUCAUCAAGCCCAUCCUGGAGAAGAUGGACGGCACCGA
GGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACCGGGAGGACCUGCUGCGG
AAGCAGCGGACCUUCGACAACGGCUCCAUCCCCCACCAGA
UCCACCUGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUGCGGCGGCAGGA
GGACUUCUACCCCUUCCUGAAGGACAACCGGGAGAAGAUC
GAGAAGAUCCUGACCUUCCGGAUCCCCUACUACGUGGGCC
CCCUGGCCCGGGGCAACUCCCGGUUCGCCUGGAUGACCCG
GAAGUCCGAGGAGACCAUCACCCCCUGGAACUUCGAGGAG
GUGGUGGACAAGGGCGCCUCCGCCCAGUCCUUCAUCGAGC
GGAUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAACGAGAAGGU
GCUGCCCAAGCACUCCCUGCUGUACGAGUACUUCACCGUG
UACAACGAGCUGACCAAGGUGAAGUACGUGACCGAGGGCA
UGCGGAAGCCCGCCUUCCUGUCCGGCGAGCAGAAGAAGGC
CAUCGUGGACCUGCUGUUCAAGACCAACCGGAAGGUGACC
GUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUCAAGAAGAUCGAGU
GCUUCGACUCCGUGGAGAUCUCCGGCGUGGAGGACCGGUU
CAACGCCUCCCUGGGCACCUACCACGACCUGCUGAAGAUC
AUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAGGAGAACGAGG
ACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACCCUGUUCGA
GGACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAGACCUACGCC

CACCUGUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGGC
GGCGGUACACCGGCUGGGGCCGGCUGUCCCGGAAGCUGAU
CAACGGCAUCCGGGGACAAGCAGUCCGGCAAGACCAUCCUG
GACUUCCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCAACCGGAACUUCA
UGCAGCUGAUCCACGACGACUCCCUGACCUUCAAGGAGGA
CAUCCAGAAGGCCCAGGUGUCCGGCCAGGGCGACUCCCUG
CACGAGCACAUCGCCAACCUGGCCGGCUCCCCCGCCAUCA
AGAAGGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGGACGAGCU
GGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACAUCGUG
AUCGAGAUGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCC
AGAAGAACUCCCGGGAGCGGAUGAAGCGGAUCGAGGAGGG
CAUCAAGGAGCUGGGCUCCCAGAUCCUGAAGGAGCACCCC
GUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUACCUGU
ACUACCUGCAGAACGGCCGGGACAUGUACGUGGACCAGGA
GCUGGACAUCAACCGGCUGUCCGACUACGACGUGGACCACA
AUCGUGCCCCAGUCCUUCCUGAAGGACGACUCCAUCGACA
ACAAGGUGCUGACCCGGUCCGACAAGAACCGGGGCAAGUC
CGACAACGUGCCCUCCGAGGAGGUGGUGAAGAAGAUGAAG
AACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUCACCC
AGCGGAAGUUCGACAACCUGACCAAGGCCGAGCGGGGCGG
CCUGUCCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGGCAG
CUGGUGGAGACCCGGCAGAUCACCAAGCACGUGGCCCAGA
UCCUGGACUCCCGGAUGAACACCAAGUACGACGAGAACGA
CAAGCUGAUCCGGGAGGUGAAGGUGAUCACCCUGAAGUCC
AAGCUGGUGUCCGACUUCCGGAAGGACUUCCAGUUCUACA
AGGUGCGGGAGAUCAACAACUACCACCACGCCCACGACGC
CUACCUGAACGCCGUGGUGGGCACCGCCCUGAUCAAGAAG
UACCCCAAGCUGGAGUCCGAGUUCGUGUACGGCGACUACA
AGGUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUCGCCAAGUCCGAGCA
GGAGAUCGGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCUACUCC
AACAUCAUGAACUUCUUCAAGACCGAGAUCACCCUGGCCA
ACGGCGAGAUCCGGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACCAACGG
CGAGACCGGCGAGAUCGUGUGGGACAAGGGCCGGGACUUC
GCCACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUGCCCCAGGUGAACA
UCGUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACCGGCGGCUUCUCCAA
GGAGUCCAUCCUGCCCAAGCGGAACUCCGACAAGCUGAUC
GCCCGGAAGAAGGACUGGGACCCCAAGAAGUACGGCGGCU
UCGACUCCCCCACCGUGGCCUACUCCGUGCUGGUGGUGGC
CAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAGCUGAAGUCCGUG
AAGGAGCUGCUGGGCAUCACCAUCAUGGAGCGGUCCUCCU
UCGAGAAGAACCCCAUCGACUUCCUGGAGGCCAAGGGCUA
CAAGGAGGUGAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCCAAG
UACUCCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCGGAAGCGGAUGC
UGGCCUCCGCCGGCGAGCUGCAGAAGGGCAACGAGCUGGC
CCUGCCCUCCAAGUACGUGAACUUCCUGUACCUGGCCUCC
CACUACGAGAAGCUGAAGGGCUCCCCCGAGGACAACGAGC
AGAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCACAAGCACUACCUGGA
CGAGAUCAUCGAGCAGAUCUCCGAGUUCUCCAAGCGGGUG
AUCCUGGCCGACGCCAACCUGGACAAGGUGCUGUCCGCCU
ACAACAAGCACCGGGACAAGCCCAUCCGGGAGCAGGCCGA

GAACAUCAUCCACCUGUUCACCCUGACCAACCUGGGCGCC
CCCGCCGCCUUCAAGUACUUCGACACCACCAUCGACCGGA
AGCGGUACACCUCCACCAAGGAGGUGCUGGACGCCACCCU
GAUCCACCAGUCCAUCACCGGCCUGUACGAGACCCGGAUC
GACCUGUCCCAGCUGGGCGGCGACGGCGGGCGGCUCCCCCA
AGAAGAAGCGGAAGGUGUGA

【００４２】

Ｃａｓ９の例示的なアミノ酸配列（配列番号９４）

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDR
HSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRIC
YLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFG
NIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH
MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENP
INASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGN
LIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLA
QIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS
MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYA
GYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLR
KQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKI
EKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEE
VVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTV
YNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVT
VKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKI
IKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA
HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTIL
DFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSL
HEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIV
IEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHP
VENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDH
IVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMK
NYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQ
LVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS
KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKK
YPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYS
NIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDF
ATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLI
ARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSV
KELLGITLAGERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPK
YSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLAS
HYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRV
ILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGA
PAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRI
DLSQLGGDGGGSPKKKRKV

【００４３】

Ｃａｓ９の例示的なオープンリーディングフレーム（配列番号９５）

AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAA
ACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGU
CCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGA
CACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCG
ACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAAC

AGCAAGAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGC
UACCUGCAGGAAAUCUUCAGCAACGAAAAUGGCAAAAGGUCG
ACGACAGCUUCUUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCCUGGU
CGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAAGACACCCGAUCUUCGGA
AACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAAGUACCCGA
CAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGA
CAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACC
AUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCCUGAUCGAAGGAGACC
UGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCCA
GCUGGUCCAGACAUACAACCCAGCUGUUCGAAGAAAACCCG
AUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCG
CAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGC
ACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAAC
CUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGA
GCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAG
CAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCA
CAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUGUUCCUGGCAGCAA
AGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAG
AGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGC
AUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACAC
UGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUA
CAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCA
GGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACA
AGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGA
AGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGA
AAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCACCAGA
UCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGA
AGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUC
GAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGAC
CGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAG
AAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAA
GUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAA
GAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGU
CCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUC
UACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAA
UGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGC
AAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACA
GUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAU
GCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUU
CAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUC
AUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAAG
ACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGA
AGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCA
CACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAA
GAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAU
CAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUG
GACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCA
UGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGA
CAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUG
CACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCA

AGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACU
GGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUC
AUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGAC
AGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGG
AAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCG
GUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGU
ACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCCAGGA
ACUGGACAUCAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACC
AUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACA
ACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAG
CGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAG
AACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACAC
AGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGG
ACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAG
CUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGA
UCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGA
CAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGC
AAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACA
AGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGC
AUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAG
UACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACA
AGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACA
GGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGC
AACAUCAUGAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAA
ACGGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGG
AGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUC
GCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACA
UCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAA
GGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUC
GCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAU
UCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGC
AAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUC
AAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCU
UCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUA
CAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAG
UACAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAAGAGAAUGC
UGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGC
ACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGC
CACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAAC
AGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGA
CGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUC
AUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAU
ACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGA
AAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCA
CCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAUCGACAGAA
AGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACU
GAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUC
GACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGA
AGAAGAAGAGAAAGGUCUAG

【００４４】

本明細書で使用される場合、「リボ核タンパク質」（ＲＮＰ）または「ＲＮＰ複合体」は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えば、Ｃａｓヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓクリベース、Ｃａｓニッカーゼ、またはｄＣａｓ　ＤＮＡ結合剤（例えば、Ｃａｓ９）とともに含むガイドＲＮＡを指す。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡは、Ｃａｓ９などのＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を標的配列へとガイドし、ガイドＲＮＡは、標的配列とハイブリダイズし、薬剤が標的配列に結合し、その場合、この薬剤はクリベースまたはニッカーゼであり、結合の後に切断またはニッキングを行うことができる。

【００４５】

本明細書で使用される場合、「標的配列」は、ｇＲＮＡのガイド配列に対して相補性を有する、すなわち、ガイド配列に対してガイド配列の特異的結合を可能にするのに十分に相補的である、標的遺伝子内の核酸配列を指す。標的配列とガイド配列との相互作用により、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、標的配列内で結合し、潜在的に（薬剤の活性に応じて）ニックを形成するか、または切断するように指向される。

【００４６】

本明細書で使用される場合、第２の配列に対する第１の配列のアラインメントにより、第２の配列の位置の全体での全てが第１の配列によって一致することが示される場合、第１の配列は、第２の配列と「同一」であるか、または「１００％の同一性を有する」とみなされる。例えば、配列ＡＡＧＡは、配列ＡＡＧに対して１００％の同一性を有するが、その理由は、アラインメントが、第１の配列の３つの全ての位置においてギャップなしで一致があるという点で１００％の同一性を与えるからである。１００％未満の同一性は、通常の方法を使用して計算することができる。例えば、第１の配列の３つの位置のうちの２つが第２の配列と一致するため、ＡＣＧは、ＡＡＧＡと６７％の同一性を有するであろう（２／３＝６７％）。ＲＮＡとＤＮＡとの間の差（一般に、チミジンをウリジンに交換すること、またはその逆）、及び修飾ウリジンなどのヌクレオシド類似体の存在は、関連するヌクレオチド（チミジン、ウリジン、または修飾ウリジンなど）が同じ相補体（例えば、チミジン、ウリジン、または修飾ウリジンの全てについてのアデノシン；別の例は、シトシン及び５－メチルシトシンであり、これらの両方が相補体としてグアノシンまたは修飾グアノシンを有する）を有する限り、ポリヌクレオチド間の同一性または相補性の差に寄与しない。したがって、例えば、Ｘがいずれかの修飾ウリジン、例えば、シュードウリジン、Ｎ１－メチルシュードウリジン、または５－メトキシウリジンである配列５’－ＡＸＧは、両方とも同じ配列（５’－ＣＡＵ）に完全に相補的である点において、ＡＵＧと１００％同一であるとみなされる。例示的なアラインメントアルゴリズムは、当該技術分野において周知である、Ｓｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎ及びＮｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズムである。当業者は、アラインメントされる配列の所与の対について、どのようなアルゴリズム及びパラメータ設定の選択が適切であるかを理解するであろう。一般的に類似する長さ及び予想される同一性がアミノ酸については５０％超の配列、またはヌクレオチドについては７５％超の配列に関して、ｗｗｗ．ｅｂｉ．ａｃ．ｕｋウェブサーバでＥＢＩによって提供されるＮｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズムインターフェースのデフォルト設定を用いたＮｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズムが一般的に適切である。

【００４７】

同様に、本明細書で使用される場合、第１の配列のヌクレオチドの全てが、ギャップなしで第２の配列に対して相補的であるとき、第１の配列は、第２の配列に対して「完全に相補的」または１００％相補的」であるとみなされる。例えば、配列ＵＣＵは、ギャップなしで、第１の配列からの核酸塩基の各々が第２の配列のヌクレオチドと塩基対合しているため、配列ＡＡＧＡに対して完全に相補的であるとみなされるであろう。配列ＵＧＵは、第１の配列の３つの核酸塩基のうちの２つが第２の配列の核酸塩基と塩基対合しているため、配列ＡＡＧＡに対して６７％相補的であるとみなされる。当業者は、例えば、ＮＣＢＩ　ＢＬＡＳＴインターフェース（ｂｌａｓｔ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／Ｂｌａｓｔ．ｃｇｉ）またはＮｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズムを使用して

、任意の配列の対について相補性パーセントを決定するために、様々なパラメータ設定でアルゴリズムが利用可能であることを理解するであろう。

【００４８】

「ｍＲＮＡ」は、ポリペプチドへと翻訳することができる（すなわち、リボソーム及びアミノアシル化ｔＲＮＡによる翻訳のための基質として機能し得る）オープンリーディングフレームを含む、ポリヌクレオチドを指すために本明細書で使用される。ｍＲＮＡは、リボース残基またはその類似体を含むリン酸糖骨格（例えば、２’－メトキシリボース残基）を含むことができる。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡリン酸糖骨格の糖は、リボース残基、２’－メトキシリボース残基、またはそれらの組み合わせから本質的になる。

【００４９】

本明細書に記載のガイドＲＮＡ組成物及び方法に有用な例示的なガイド配列を、表１及び本出願全体に示す。例えば、表１がガイド配列を示す場合、このガイド配列をガイドＲＮＡで使用して、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えば、ヌクレアーゼ、例えば、ＣａｓヌクレアーゼⅠ、例えば、Ｃａｓ９を標的配列に指向することができる。標的配列は、ゲノム座標として表１に提供され、ゲノムＤＮＡのプラス鎖とマイナス鎖（すなわち、与えられる配列と、配列の逆相補体）の両方を含む。いくつかの実施形態では、ガイド配列が、標的配列の逆相補体に結合する場合、ガイド配列は、ガイド配列におけるＵのＴへの置換を除いて、標的配列の特定のヌクレオチド（例えば、ＰＡＭを含まない標的配列）と同一である。

【００５０】

本明細書で使用される場合、「インデル」は、標的核酸内の二本鎖切断（ＤＳＢ）の部位において挿入されるか、または欠失するかのいずれかである多数のヌクレオチドからなる挿入／欠失変異を指す。

【００５１】

本明細書で使用される場合、「発現を阻害する」は、特定の遺伝子産物（例えば、タンパク質、ｍＲＮＡ、またはその両方）の発現の減少を指す。タンパク質（すなわち、遺伝子産物）の発現は、目的の組織または細胞集団からのタンパク質の総細胞量を、細胞集団の個々のメンバーとしてのタンパク質の発現を、例えば、タンパク質を発現する細胞のパーセントを定義するための細胞選別によって、または集団中の細胞におけるタンパク質の発現を、例えば、ＥＬＩＳＡもしくはウェスタンブロットによって、検出することによって測定することができる。発現の阻害は、全長遺伝子産物または任意の遺伝子産物が、もはや発現されなくなるような、遺伝子配列、例えば、ゲノム配列の遺伝子修飾、例えば、遺伝子のノックダウンから生じ得る。特定の遺伝子修飾は、全長遺伝子産物の翻訳を妨げるフレームシフトまたはナンセンス変異の導入をもたらし得る。スプライス部位、例えば、スプライスアクセプター部位またはスプライスドナー部位に十分に近い位置での遺伝子修飾は、スプライシングを破壊するために、全長タンパク質の翻訳を妨げることができる。発現の阻害は、遺伝子産物、例えば、プロモーター配列、３’ＵＴＲ配列、例えば、キャッピング配列、５’ＵＴＲ配列、例えば、ポリＡ配列の発現に必要なゲノム配列内の調節配列における遺伝子修飾に起因し得る。また、発現の阻害は、遺伝子産物の翻訳に必要な調節因子の発現または活性、例えば、遺伝子産物の産生を妨げることに起因し得る。例えば、全長転写因子の発現を阻害する転写因子配列の遺伝子修飾は、下流効果を有し、転写因子によって制御される１つ以上の遺伝子産物の発現の発現を阻害することができる。したがって、発現の阻害は、ゲノムまたはｍＲＮＡ配列の変化によって予測することができる。したがって、発現の阻害をもたらすと予想される変異は、目的の組織または細胞集団から単離されたｍＲＮＡのシークエンシングを含む既知の方法によって検出することができる。発現の阻害は、タンパク質の所定の発現レベル、すなわち、少なくとも特定のレベルで目的のタンパク質を発現する集団内の細胞のパーセントまたは数の減少を有する集団内の細胞のパーセントとして決定することができる。発現の阻害はまた、例えば、細胞または組織試料、例えば、生検試料における全体的なタンパク質レベルの減少を決定することによって評価することができる。特定の実施形態では、分泌タンパク質の発現の阻害

は、流体試料、例えば、細胞培地または体液中で評価することができる。タンパク質は、タンパク質レベルの分析を可能にするために、体液、例えば、血液または尿中に存在し得る。特定の実施形態では、タンパク質レベルは、タンパク質活性または代謝産物のレベル、例えば、尿または血液中のタンパク質活性または代謝産物のレベルによって決定され得る。いくつかの実施形態では、「発現の阻害」は、特定の遺伝子産物の発現のいくつかの喪失、例えば、転写されるｍＲＮＡの量の減少、または細胞集団によって発現されるタンパク質の量の減少を指し得る。いくつかの実施形態では、「阻害」は、特定の遺伝子産物、例えば、細胞表面におけるＬＡＧ３遺伝子産物の発現のある程度の喪失を指し得る。ノックダウンのレベルは、同じタイプの対象試料における開始レベルに対して相対的であることが理解される。例えば、タンパク質レベルのルーチンモニタリングは、組織試料（例えば、生検試料）よりも、対象（例えば、血液または尿）からの流体試料においてより容易に実施される。ノックダウンのレベルは、アッセイされている試料についてであることが理解される。同様に、連続した組織試料、例えば、肝臓組織が得られ得る動物研究において、ノックダウン標的は、他の組織において発現され得る。したがって、ノックダウンのレベルは、必ずしも全身的なノックダウンのレベルではなく、試料採取される組織、細胞型、または流体内のノックダウンのレベルである。

【００５２】

本明細書で使用される場合、「遺伝子修飾」は、例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｇＲＮＡ及びＣａｓ９系によって誘導される、ＤＮＡレベルでの変化である。遺伝子修飾は、典型的には、定義された配列またはゲノム遺伝子座内で、挿入、欠失、または置換（すなわち、塩基配列置換、すなわち、変異）を含み得る。遺伝子修飾は、ＤＮＡの核酸配列を変化させる。遺伝子修飾は、単一のヌクレオチド位置にあり得る。遺伝子修飾は、複数のヌクレオチド、例えば、２、３、４、５個以上のヌクレオチド、典型的には、互いに近接している、例えば、連続ヌクレオチドであってよい。遺伝子修飾は、コード配列、例えば、エクソン配列内にあり得る。遺伝子修飾は、スプライス部位、すなわち、スプライスアクセプター部位またはスプライスドナー部位に十分に近い位置にあり、スプライシングを破壊することができる。遺伝子修飾は、ゲノム遺伝子座に内因性ではないヌクレオチド配列の挿入、例えば、異種のオープンリーディングフレームまたは遺伝子のコード配列の挿入を含むことができる。本明細書で使用される場合、好ましくは、遺伝子修飾は、ゲノム遺伝子座の遺伝子修飾の前に、全長タンパク質のアミノ酸配列を有する全長タンパク質の翻訳を防止する。全長タンパク質または遺伝子産物の翻訳の防止は、任意の長さのタンパク質または遺伝子産物の翻訳の防止を含む。例えば、早期終止コドンの生成をもたらすフレームシフト変異によって、またはナンセンス変異の生成によって、全長タンパク質の翻訳を防止することができる。全長タンパク質の翻訳は、スプライシングの破壊によって防止することができる。

【００５３】

本明細書で使用される場合、「異種コード配列」は、細胞内の外因性ソースとして導入された（例えば、ＴＣＲ遺伝子座を含むセーフハーバー遺伝子座などのゲノム遺伝子座に挿入された）コード配列を指す。すなわち、導入されたコード配列は、少なくともその挿入部位に関して異種である。そのような異種コード配列遺伝子から発現されるポリペプチドは、「異種ポリペプチド」と称される。異種コード配列は、天然に存在するか、または操作することができ、野生型またはバリアントであり得る。異種コード配列は、異種ポリペプチドをコードする配列（例えば、内部リボソーム侵入部位）以外のヌクレオチド配列を含み得る。異種コード配列は、野生型またはバリアント（例えば、変異体）として、ゲノム内で天然に存在するコード配列であり得る。例えば、細胞は（野生型またはバリアントとして）目的のコード配列を含有するが、同じコード配列またはそのバリアントを、例えば、高発現の遺伝子座での発現のための外因性ソースとして導入することができる。異種ｇコード配列はまた、ゲノム中に天然に存在しないか、またはゲノム中に天然に存在しない異種ポリペプチドを発現するコード配列であり得る。「異種コード配列」、「外因性コード配列」、及び「導入遺伝子」は、互換的に使用される。いくつかの実施形態では、

異種コード配列または導入遺伝子は、外因性核酸配列を含み、例えば、核酸配列は、レシピエント細胞に内因性ではない。いくつかの実施形態では、異種コード配列または導入遺伝子は、外因性核酸配列、例えば、レシピエント細胞内に天然に存在しない核酸配列を含む。例えば、異種コード配列は、その挿入部位に関して、及びそのレシピエント細胞に関して異種であり得る。

【００５４】

「セーフハーバー」遺伝子座は、遺伝子が細胞に著しい有害な影響を及ぼすことなく挿入され得るゲノム内の遺伝子座である。本明細書で使用するためにヌクレアーゼ（複数可）によって標的とされるセーフハーバー遺伝子座の非限定的な例としては、ＡＡＶＳ１（ＰＰＰ１　Ｒ１２Ｃ）、ＴＣＲ、Ｂ２Ｍが挙げられる。いくつかの実施形態では、ＴＲＣ遺伝子、例えば、ＴＲＡＣ遺伝子などのノックダウンを標的とする遺伝子座または遺伝子座（複数）における挿入は、細胞にとって有利である。他の好適なセーフハーバー遺伝子座は、当該技術分野において既知である。

【００５５】

本明細書で使用される場合、「標的化受容体」は、細胞、例えば、Ｔ細胞の表面上に存在して、標的部位、例えば、生物内の特定の細胞または組織への細胞の結合を可能にする受容体を指す。標的化受容体としては、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）、及びタンパク質の細胞外受容体部分の結合時にＴ細胞を活性化することができる内部シグナル伝達ドメイン内の少なくとも膜貫通ドメインを通して作動可能に連結された細胞表面分子の受容体が挙げられるが、これらに限定されない。

【００５６】

本明細書で使用される場合、キメラ抗原受容体は、細胞外抗原認識ドメイン、例えば、抗原が結合されるときにＴ細胞を活性化する細胞内シグナル伝達ドメインに作動可能に連結される、ｓｃＦｖ、ＶＨＨ、ナノボディを指す。ＣＡＲは、抗原認識ドメイン、細胞外ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、及び細胞内Ｔ細胞シグナル伝達ドメインの４つの領域で構成される。そのような受容体は、当該技術分野において周知である（例えば、各々の内容の対応する部分が参照により本明細書に組み込まれる、ＷＯ２０２００９２０５７、ＷＯ２０１９１９１１１４、ＷＯ２０１９１４７８０５、ＷＯ２０１８２０８８３７を参照のこと）。アダプター分子を介した標的細胞への免疫細胞の結合を促進する逆ユニバーサルＣＡＲ（例えば、その内容全体が本明細書に組み込まれる、ＷＯ２０１９２３８７２２を参照のこと）も企図される。ＣＡＲは、抗体が開発され得る任意の抗原を標的とすることができ、典型的には、標的とされる細胞または組織の表面上に表示される分子を対象とする。

【００５７】

本明細書で使用される場合、「治療」は、対象における疾患または障害のための投与または治療の任意の適用を指し、その疾患を阻害すること、その進行を止めること、その疾患の１つ以上の症状を緩和すること、その疾患を治癒させること、その疾患の１つ以上の症状を防止すること、またはその疾患の１つ以上の症状の再発を防止することを含む。自己免疫応答または炎症応答または障害を治療することは、疾患特異的症状の緩和をもたらす特定の障害に関連する炎症を緩和することを含み得る。本明細書に記載される操作されたＴ細胞による治療は、追加の治療薬、例えば、治療される適応症の標準的なケアの前、後、またはそれと組み合わせて使用され得る。

【００５８】

ヒト野生型ＬＡＧ３配列は、ＮＣＢＩ　Ｇｅｎｅ　ＩＤ：３９０２（ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｇｅｎｅ／３９０２、本出願の出願日に入手可能なバージョン）で入手可能である；Ｅｎｓｅｍｂｌ：ＥＮＳＧ０００００００８９６９２，ｃｈｒ１２：６７７２４８３－６７７８４５５。リンパ球活性化タンパク質３は、Ｉｇスーパーファミリーに属し、４つの細胞外Ｉｇ様ドメインを含む。ＬＡＧ３遺伝子は、８個のエクソンを含む。配列データ、エクソン／イントロン組織、及び染色体局在性は、すべて、ＬＡＧ３とＣＤ４との密接な関係を示している。リンパ球活性化３、ＣＤ２２３、及びＦＤＣ４

は、ＬＡＧ３の遺伝子異名である。

【００５９】

本明細書で使用される場合、「Ｔ細胞受容体」または「ＴＣＲ」は、Ｔ細胞における受容体を指す。一般に、ＴＣＲは、２つのＴＣＲポリペプチド鎖、α及びβを含有するヘテロ二量体受容体分子である。α及びβ鎖ＴＣＲポリペプチドは、様々なＣＤ３分子と複合体化し、抗原結合後に炎症及び自己免疫を含む免疫応答（複数可）を誘発することができる。本明細書で使用される場合、ＴＣＲのノックダウンは、任意のＴＣＲ遺伝子の部分的または全体的なノックダウン、例えば、単独で、または他のＴＣＲ遺伝子（複数可）の部分的または全体のノックダウンとの組み合わせで、ＴＲＢＣ１遺伝子の一部の欠失を指す。

【００６０】

「ＴＲＡＣ」は、Ｔ細胞受容体α鎖を指すために使用される。ヒト野生型ＴＲＡＣ配列は、ＮＣＢＩ　Ｇｅｎｅ　ＩＤ：２８７５５；Ｅｎｓｅｍｂｌ：ＥＮＳＧ００００００２７７７３４で利用可能である。Ｔ細胞受容体アルファ定数、ＴＣＲＡ、ＩＭＤ７、ＴＲＣＡ及びＴＲＡは、ＴＲＡＣの遺伝子同義語である。

【００６１】

「ＴＲＢＣ」は、Ｔ細胞受容体β鎖、例えば、ＴＲＢＣ１及びＴＲＢＣ２を指すために使用される。「ＴＲＢＣ１」及び「ＴＲＢＣ２」は、Ｔ細胞受容体β鎖をコードする２つの相同遺伝子を指し、これらは、ＴＲＢＣ１またはＴＲＢＣ２遺伝子の遺伝子産物である。

【００６２】

ヒト野生型ＴＲＢＣ１配列は、ＮＣＢＩ　Ｇｅｎｅ　ＩＤ：２８６３９；Ｅｎｓｅｍｂｌ：ＥＮＳＧ００００００２１１７５１で利用可能である。Ｔ細胞受容体ベータ定数、Ｖ＿セグメント翻訳産物、ＢＶ０５Ｓ１Ｊ２．２、ＴＣＲＢＣ１、及びＴＣＲＢは、ＴＲＢＣ１の遺伝子同義語である。

【００６３】

ヒト野生型ＴＲＢＣ２配列は、ＮＣＢＩ　Ｇｅｎｅ　ＩＤ：２８６３８；Ｅｎｓｅｍｂｌ：ＥＮＳＧ００００００２１１７７２で利用可能である。Ｔ細胞受容体ベータ定数、Ｖ＿セグメント翻訳産物、及びＴＣＲＢＣ２は、ＴＲＢＣ２の遺伝子同義語である。

【００６４】

「Ｔ細胞」は、抗原への曝露後の免疫応答において中心的な役割を果たす。例えば、Ｔ細胞が、エンジニアリングによって、例えば、幹細胞から、または分化転換によって、例えば、体細胞をリプログラミングすることによって形成されるとき、Ｔ細胞は、天然に存在し得るか、または非天然であり得る。Ｔ細胞は、細胞表面上のＴ細胞受容体の存在によって他のリンパ球と区別することができる。この定義には、ヘルパーＣＤ４＋Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８＋Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及び調節ＣＤ４＋Ｔ細胞を含む、従来の適応性Ｔ細胞、ならびにナチュラルキラーＴ細胞、粘膜関連不変Ｔ細胞、及びガンマデルタＴ細胞を含む自然様Ｔ細胞が含まれる。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ＣＤ４＋である。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ＣＤ３＋／ＣＤ４＋である。

【００６５】

本明細書で使用される場合、「ＭＨＣ」または「ＭＨＣタンパク質」は、主要な組織適合性複合体分子（または複数）を指し、例えば、ＭＨＣクラスＩ分子（例えば、ヒトにおけるＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、及びＨＬＡ－Ｃ）ならびにＭＨＣクラスＩＩ分子（例えば、ヒトにおけるＨＬＡ－ＤＰ、ＨＬＡ－ＤＱ、及びＨＬＡ－ＤＲ）を含む。

【００６６】

「ＣＩＩＴＡ」または「ＣＩＩＴＡ」または「Ｃ２ＴＡ」は、本明細書で使用される場合、「クラスＩＩ主要組織適合性複合体トランスアクチベーター」の核酸配列またはタンパク質配列を指し、ヒト遺伝子は、受託番号ＮＣ＿０００００１６．１０（範囲１０８６６２０８．．１０９４１５６２）、参照ＧＲＣｈ３８．ｐ１３を有する。核内のＣＩＩＴＡタンパク質は、ＭＨＣクラスＩＩ遺伝子転写の陽性調節因子として作用し、ＭＨＣクラス

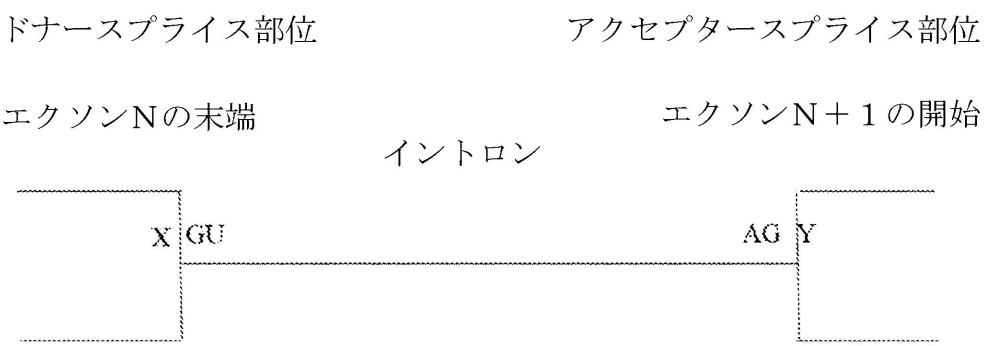
ＩＩタンパク質発現に必要である。
【００６７】
「β２Ｍ」または「Ｂ２Ｍ」は、本明細書で使用される場合、「β－２ミクログロブリン」の核酸配列またはタンパク質配列を指し、ヒト遺伝子は、受託番号ＮＣ＿０００００１５（範囲４４７１１４９２．．４４７１８８７７）、参照ＧＲＣｈ３８．ｐ１３を有する。Ｂ２Ｍタンパク質は、核化細胞の表面上のヘテロ二量体としてＭＨＣクラスＩ分子と関連しており、ＭＨＣクラスＩタンパク質発現に必要である。
【００６８】
「ＨＬＡ－Ａ」という用語は、ＨＬＡ－Ａタンパク質の文脈で本明細書で使用される場合、重鎖（ＨＬＡ－Ａ遺伝子によってコードされる）及び軽鎖（すなわち、ベーター２ミクログロブリン）からなるヘテロ二量体である、ＭＨＣクラスＩタンパク質分子を指す。「ＨＬＡ－Ａ」または「ＨＬＡ－Ａ遺伝子」という用語は、核酸の文脈で本明細書で使用される場合、ＨＬＡ－Ａタンパク質分子の重鎖をコードする遺伝子を指す。ＨＬＡ－Ａ遺伝子は、「ＨＬＡクラスＩ組織適合性、Ａアルファ鎖」とも称され、ヒト遺伝子は、受託番号ＮＣ＿０００００６．１２（２９９４２５３２．．２９９４５８７０）を有する。ＨＬＡ－Ａ遺伝子は、集団全体にわたって何千もの異なるバージョン（「対立遺伝子とも称される）を有することが知られている（また個体は、ＨＬＡ－Ａ遺伝子の２つの異なる対立遺伝子を受け取ることができる）。配列情報を含むＨＬＡ－Ａ対立遺伝子の公開データベースは、ＩＰＤ－ＩＭＧＴ／ＨＬＡ：ｗｗｗ．ｅｂｉ．ａｃ．ｕｋ／ｉｐｄ／ｉｍｇｔ／ｈｌａ／でアクセスすることができる。ＨＬＡ－Ａの全ての対立遺伝子は、「ＨＬＡ－Ａ」及び「ＨＬＡ－Ａ遺伝子」という用語によって包含される。
【００６９】
本明細書で使用される場合、「ゲノム座標内」という用語は、与えられたゲノム座標範囲の境界を含む。例えば、ｃｈｒ６：２９９４２８５４－ｃｈｒ６：２９９４２９１３が与えられた場合、座標ｃｈｒ６：２９９４２８５４－ｃｈｒ６：２９９４２９１３が包含される。本出願を通して、参照されるゲノム座標は、国立バイオテクノロジー情報センターのウェブサイトで入手可能なゲノム参照コンソーシアムからのヒトゲノムのＧＲＣｈ３８（ｈｇ３８とも称される）アセンブリにおけるゲノム注釈に基づいている。１つのアセンブリと別のアセンブリとの間でゲノム座標を変換するためのツール及び方法は、当該技術分野において既知であり、同じ機関によって、または同じアルゴリズムを使用して生成された以前のアセンブリへの変換（例えば、ＧＲＣｈ３８からＧＲＣｈ３７への）、及び異なる機関またはアルゴリズムによって生成されたアセンブリの変換（例えば、ＧＲＣｈ３８から国際ヒトゲノムシークエンシングコンソーシアムによって生成されたＮＣＢＩ３３への）を含む、本明細書に提供されるゲノム座標をヒトゲノムの別のアセンブリの対応する座標に変換するために使用され得る。当該技術分野において既知の利用可能な方法及びツールとしては、国立バイオテクノロジー情報センターのウェブサイトで入手可能なＮＣＢＩゲノム再マッピングサービス、ＵＣＳＣ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｂｒｏｗｅｒのウェブサイトで入手可能なＵＣＳＣ　ＬｉｆｔＯｖｅｒ、及びＥｎｓｅｍｂｌ．ｏｒｇのウェブサイトで入手可能なＡｓｓｅｍｂｌｙ　Ｃｏｎｖｅｒｔｅｒが挙げられるが、これらに限定されない。
【００７０】
本明細書で使用される「スプライス部位」は、アクセプタースプライス部位もしくはドナースプライス部位（以下に定義する）を構成する３個のヌクレオチド、またはスプライス部位の一部である当該技術分野で既知の任意の他のヌクレオチドを指す。例えば、Ｂｕｒｓｅｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　２８（２１）：４３６４－４３７５（２０００）（乳類ゲノムにおけるカノニカル及び非標準的なスプライス部位を記載する）を参照のこと。「アクセプタースプライス部位」を構成する３個のヌクレオチドは、イントロンの３’における２つの保存された残基（例えば、ヒトにおけるＡＧ）及び境界ヌクレオチド（すなわち、ＡＧのエクソン３’の第１のヌクレオチド）である。アクセプタースプライス部位の「スプライス部位境界ヌクレオチド」は、以

下の図では「Ｙ」と表記され、本明細書では「アクセプタースプライス部位境界ヌクレオチド」または「スプライスアクセプター部位境界ヌクレオチド」とも称され得る。「アクセプタースプライス部位」、「スプライスアクセプター部位」、「アクセプタースプライス配列」、または「スプライスアクセプター配列」という用語は、本明細書では互換的に使用され得る。

【００７１】

「ドナースプライス部位」を構成する３個のヌクレオチドは、イントロン及び境界ヌクレオチド（すなわち、ＧＴのエクソン５’の第１のヌクレオチド）の５’末端における２つの保存された残基（例えば、ヒトにおけるＧＴ（遺伝子）またはＧＵ（ｐｒｅ－ｍＲＮＡなどのＲＮＡにおける）である。ドナースプライス部位の「スプライス部位境界ヌクレオチド」は、以下の図では「Ｘ」と表記され、本明細書では「ドナースプライス部位境界ヌクレオチド」または「スプライスドナー部位境界ヌクレオチド」とも称され得る。「ドナースプライス部位」、「スプライスドナー部位」、「ドナースプライス配列」、または「スプライスドナー配列」という用語は、本明細書では互換的に使用され得る。

【化１】



【００７２】

ＩＩ．組成物

Ａ．ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含む組成物

ＤＮＡ配列を改変する、例えば、ガイドＲＮＡをＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系）とともに使用して、ＬＡＧ３遺伝子内で一本鎖切断（ＳＳＢ）または二本鎖切断（ＤＳＢ）を誘導するのに有用な組成物が本明細書に提供される。ＬＡＧ３遺伝子を標的とするガイド配列は、表１に配列番号１～８８で示され、そのようなガイドＲＮＡが標的とするゲノム座標も同様である。

【００７３】

表１に配列番号１～８８で示される各々のガイド配列は、ｃｒＲＮＡを形成するための追加のヌクレオチドをさらに含んでいてもよく、例えば、その３’末端で、ガイド配列に続く以下の例示的なヌクレオチド配列を有する。５’から３’への配向で、ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＵＧＣＵＧＵＵＵＵＧ（配列番号２００）。

【００７４】

ｓｇＲＮＡの場合、上述のガイド配列は、ｓｇＲＮＡを形成するための追加のヌクレオチドをさらに含んでいてもよく、例えば、ガイド配列の３’末端に続く以下の例示的なヌクレオチド配列を有する。５’から３’への配向で、ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ（配列番号２０１）。

【００７５】

ｓｇＲＮＡの場合、上述のガイド配列は、ｓｇＲＮＡを形成するための追加のヌクレオチドをさらに含んでいてもよく、例えば、ガイド配列の３’末端に続く以下の例示的なヌクレオチド配列を有する。５’から３’への配向で、ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵＵＵＵ（配列番号２０２）。

【００７６】

ｓｇＲＮＡの場合、ガイド配列は、以下の修飾モチーフｍＮ＊ｍＮ＊ｍＮ＊ＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＧＵＵＵＵＡＧＡｍＧｍＣｍＵｍＡｍＧｍＡｍＡｍＡｍＵｍＡｍＧｍＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡｍＡｍＣｍＵｍＵｍＧｍＡｍＡｍＡｍＡｍＡｍＡｍＧｍＵｍＧｍＧｍＣｍＡｍＣｍＣｍＧｍＡｍＧｍＵｍＣｍＧｍＧｍＵｍＧｍＣｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵ（配列番号３００）に組み込まれてもよく、ここで、「Ｎ」は、任意の天然または非天然ヌクレオチド、好ましくはＲＮＡヌクレオチドであり得、ヌクレオチドの糖部分は、リボース、デオキシリボース、または置換を有する同様の化合物であり得、ｍは、２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドであり、＊は、ヌクレオチド残基間のホスホロチオエート連結であり、Ｎは、集合的にガイド配列のヌクレオチド配列である。

【００７７】

ｓｇＲＮＡの場合、ガイド配列は、ＳｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ配列をさらに含んでいてもよい。ＳｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ配列の例は、ガイド配列の３’末端に含まれる以下の表（配列番号２０１　ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ－「例示的なＳｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ－１」）に示され、以下の表に示されるようなドメインを備えている。ＬＳは、下部ステムである。Ｂは、バルジである。ＵＳは、上部ステムである。Ｈ１及びＨ２は、それぞれ、ヘアピン１及びヘアピン２である。Ｈ１及びＨ２は、総称して、ヘアピン領域と称される。構造のモデルは、参照により本明細書に組み込まれる、ＷＯ２０１９２３７０６９の図１０Ａに提供される。

【００７８】

例示的なＳｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ－１のヌクレオチド配列は、特定の化学修飾、配列置換及び切断のためのテンプレート配列として機能し得る。

【００７９】

特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、例えば、ｓｇＲＮＡまたはｄｇＲＮＡであり、任意選択で、化学修飾を含む。いくつかの実施形態では、修飾ｓｇＲＮＡは、ガイド配列及びＳｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ配列、例えば、例示的なＳｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ－１を含む。ｓｇＲＮＡなどのｇＲＮＡは、ガイド配列の５’末端またはガイド配列の３’末端、例えば、例示的なＳｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ－１、末端ヌクレオチドのうちの１つ以上、例えば、３’末端または５’末端におけるヌクレオチドのうちの１、２、３、または４つにおける修飾を含み得る。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間ホスホロチオエート（ＰＳ）連結、及び反転した脱塩基修飾ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせから選択される。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、ＰＳ連結を含む。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオチド及びＰＳ連結を含む。

【００８０】

特定の実施形態では、（配列番号２０１「例示的なＳｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ－１」）を例として使用して、例示的なＳｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ－１は、以下のうちの１つ以上をさらに含む。

【００８１】

Ａ．短縮されたヘアピン１領域、または置換されかつ任意選択で短縮されたヘアピン１

領域であって、
１．以下のヌクレオチド対：Ｈ１－１及びＨ１－１２、Ｈ１－２及びＨ１－１１、Ｈ１－３及びＨ１－１０、またはＨ１－４及びＨ１－９のうちの少なくとも１つが、ヘアピン１においてワトソン－クリック対形成ヌクレオチドで置換されており、ヘアピン１領域が、任意選択で、
ａ．Ｈ１－５～Ｈ１－８のうちのいずれか１つもしくは２つ、
ｂ．以下のヌクレオチド対：Ｈ１－１及びＨ１－１２、Ｈ１－２及びＨ１－１１、Ｈ１－３及びＨ１－１０、ならびにＨ１－４及びＨ１－９のうちの１つ、２つ、もしくは３つ、または
ｃ．ヘアピン１領域の１～８個のヌクレオチドを欠いているか、あるいは
２．短縮されたヘアピン１領域が、４～８個のヌクレオチド、好ましくは４～６個のヌクレオチドを欠いており、
ａ．位置Ｈ１－１、Ｈ１－２、もしくはＨ１－３のうちの１つ以上が、例示的なＳｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ－１に対して欠失もしくは置換されているか、または
ｂ．位置Ｈ１－６～Ｈ１－１０のうちの１つ以上が、例示的なＳｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ－１に対して置換されているか、あるいは
３．短縮されたヘアピン１領域が、５～１０個のヌクレオチド、好ましくは５～６個のヌクレオチドを欠いており、位置Ｎ１８、Ｈ１－１２、もしくはｎのうちの１つ以上が、例示的なＳｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ－１に対して置換されている、短縮されたヘアピン１領域、あるいは

【００８２】

Ｂ．短縮された上部ステム領域であって、短縮された上部ステム領域が、１～６個のヌクレオチドを欠いており、短縮された上部ステム領域の６、７、８、９、１０、または１１個のヌクレオチドが、例示的なＳｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ－１に対して４個以下の置換を含む、短縮された上部ステム領域、あるいは

【００８３】

Ｃ．ＬＳ６、ＬＳ７、ＵＳ３、ＵＳ１０、Ｂ３、Ｎ７、Ｎ１５、Ｎ１７、Ｈ２－２及びＨ２－１４のうちのいずれか１つ以上における例示的なＳｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ－１と比較した置換であって、置換基ヌクレオチドが、アデニンが後に続くピリミジンでもなく、ピリミジンが前に存在するアデニンでもない、置換、あるいは

【００８４】

Ｄ．上部ステム領域を有する例示的なＳｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ－１であって、上部ステム修飾が、上部ステム領域におけるＵＳ１～ＵＳ１２のうちのいずれか１つ以上の修飾を含み、
１．修飾ヌクレオチドが、任意選択で、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間ホスホロチオエート（ＰＳ）連結、反転した脱塩基修飾ヌクレオチド、もしくはそれらの組み合わせから選択されるか、または
２．修飾ヌクレオチドが、任意選択で、２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオチドを含む、例示的なＳｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ－１。

【００８５】

特定の実施形態では、例示的なＳｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ－１（配列番号２０１）、または例示的なＳｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ－１を含むｓｇＲＮＡなどのｓｇＲＮＡは、３’テール、例えば、１、２、３、４個、またはそれ以上のヌクレオチドの３’テールをさらに含む。特定の実施形態では、テールは、１個以上の修飾ヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間ホスホロチオエート（ＰＳ）連結、反転した脱塩基修飾ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせから選択される。特定の実

施形態では、修飾ヌクレオチドは、２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチド間にＰＳ連結を含む。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオチド及びヌクレオチド間にＰＳ連結を含む。

【００８６】

特定の実施形態では、ヘアピン領域は、１個以上の修飾ヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間ホスホロチオエート（ＰＳ）連結、反転した脱塩基修飾ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせから選択される。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオチドを含む。

【００８７】

特定の実施形態では、上部ステム領域は、１個以上の修飾ヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間ホスホロチオエート（ＰＳ）連結、反転した脱塩基修飾ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせから選択される。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオチドを含む。

【００８８】

特定の実施形態では、例示的なＳｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ－１は、１つ以上のＹＡジヌクレオチドを含み、Ｙは、ピリミジンであり、ＹＡジヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間ホスホロチオエート（ＰＳ）連結、反転した脱塩基修飾ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせから選択される。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオチドを含む。

【００８９】

特定の実施形態では、例示的なＳｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ－１は、１つ以上のＹＡジヌクレオチドを含み、Ｙは、ピリミジンであり、ＹＡジヌクレオチドは、置換ヌクレオチド、すなわち、配列置換ヌクレオチドを含み、ピリミジンは、プリンで置換される。特定の実施形態において、ピリミジンが単一ガイド内にワトソン－クリック塩基対を形成するとき、置換されたピリミジンヌクレオチドのワトソン－クリックベースのヌクレオチドは、ワトソン－クリック塩基対を維持するために置換される。

【表１】

例示的なｓｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ－１（配列番号２０１）

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
G	U	U	U	U	A	G	A	G	C	U	A	G	A	A	A	U	A	G	C	A	A	G	U	U	A	A	A	A	U
LS1-LS6						B1-B2		US1-US12												B2-B6				LS7-LS12					

31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
A	A	G	G	C	U	A	G	U	C	C	G	U	U	A	U	C	A	A	C	U	U	G	A	A	A	A	A	G	U
ネクサス																		H1-1～H1-12											

61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76
G	G	C	A	C	C	G	A	G	U	C	G	G	U	G	C
N	H2-1～H2-15														

【表２－１】

表１：ＬＡＧ３ガイド配列及び染色体座標

配列番号	ＬＡＧ３番号	ガイド配列	ゲノム座標 (hg38)
1	ＬＡＧ３－１	GCGGUCCCUGAGGUGCACCG	chr12:6773938-6773958
2	ＬＡＧ３－２	GUUCCGGAACCAAUGCACAG	chr12:6774678-6774698
3	ＬＡＧ３－３	UUACCUGGAGCCACCCAAAG	chr12:6772894-6772914
4	ＬＡＧ３－４	GACGUUGAAGCCAUCUCUGU	chr12:6774816-6774836
5	ＬＡＧ３－５	AGAGGAAGCUUUCCGCUAAG	chr12:6774742-6774762
6	ＬＡＧ３－６	UCCCCCAGGAGGAGUCCACU	chr12:6775380-6775400
7	ＬＡＧ３－７	GUCCCCCCAUCACCACUUAG	chr12:6774727-6774747
8	ＬＡＧ３－８	UUCCGCUAAGUGGUGAUGGG	chr12:6774732-6774752
9	ＬＡＧ３－９	GCAAUGCCAGCUGUACCAGG	chr12:6777435-6777455
10	ＬＡＧ３－１０	AGAGUCCAUGGGGCUGACUU	chr12:6774771-6774791
11	ＬＡＧ３－１１	CCCGCCAUCCCCGUUUUACC	chr12:6772909-6772929
12	ＬＡＧ３－１２	GCUUUCCGCUAAGUGGUGAU	chr12:6774735-6774755
13	ＬＡＧ３－１３	CCACGCUCAGCACCGUGUAG	chr12:6773783-6773803
14	ＬＡＧ３－１４	GCUCCAGCGUACACUGUCAA	chr12:6775292-6775312
15	ＬＡＧ３－１５	UGGCAAUGCCAGCUGUACCA	chr12:6777433-6777453
16	ＬＡＧ３－１６	AGGGUGAAUCCCUUGCUCUA	chr12:6778268-6778288
17	ＬＡＧ３－１７	GGCUCACAUCCUCUAGUCGA	chr12:6775444-6775464

【表２－２】

配列番号	ＬＡＧ３番号	ガイド配列	ゲノム座標 (hg38)
18	ＬＡＧ３－１８	GUGCAUUGGUUCCGGAACCG	chr12:6774680-6774700
19	ＬＡＧ３－１９	UCGACUAGAGGAUGUGAGCC	chr12:6775444-6775464
20	ＬＡＧ３－２０	AGCGCGGGGACUUCUCGCUA	chr12:6773872-6773892
21	ＬＡＧ３－２１	CGCCCCACAUACUCGAGGCC	chr12:6773993-6774013
22	ＬＡＧ３－２２	GCGUACACUGUCAAGGGAGU	chr12:6775286-6775306
23	ＬＡＧ３－２３	CGACUUUACCCUUCGACUAG	chr12:6775432-6775452
24	ＬＡＧ３－２４	UCCAUAGGUGCCCAACGCUC	chr12:6777783-6777803
25	ＬＡＧ３－２５	CACCGCGGCGCGGUACUCGC	chr12:6773923-6773943
26	ＬＡＧ３－２６	CCAUAGGUGCCCAACGCUCU	chr12:6777784-6777804
27	ＬＡＧ３－２７	UUGGUUCCGGAACCGGGGCC	chr12:6774685-6774705
28	ＬＡＧ３－２８	ACCGUGUAGCGGCGGGGCCU	chr12:6773772-6773792
29	ＬＡＧ３－２９	CGCUACACGGUGCUGAGCGU	chr12:6773781-6773801
30	ＬＡＧ３－３０	CGCGUCCAGCUGGAUGAGCG	chr12:6773844-6773864
31	ＬＡＧ３－３１	UGACCCCUGCUCUUCGCAGA	chr12:6773297-6773317
32	ＬＡＧ３－３２	UCCAGCUGGAUGAGCGCGGC	chr12:6773848-6773868
33	ＬＡＧ３－３３	GAUGGGGGGACUCCCGGACA	chr12:6774718-6774738
34	ＬＡＧ３－３４	GCCGGCCGCGCUCAUCCAGC	chr12:6773852-6773872
35	ＬＡＧ３－３５	GCAAGGGAUUCACCCUCCGC	chr12:6778272-6778292

【表２－３】

配列番号	ＬＡＧ３番号	ガイド配列	ゲノム座標 (hg38)
36	ＬＡＧ３－３６	GUACGCUGGAGCAGGUUCCA	chr12:6775300-6775320
37	ＬＡＧ３－３７	ACUCGCCGGCGUCCGCGCGC	chr12:6773909-6773929
38	ＬＡＧ３－３８	CGCUCAGCACCGUGUAGCGG	chr12:6773780-6773800
39	ＬＡＧ３－３９	AUGAGCGCGGCCGGCAGCGC	chr12:6773857-6773877
40	ＬＡＧ３－４０	GCUCACAUCCUCUAGUCGAA	chr12:6775443-6775463
41	ＬＡＧ３－４１	UCUAAGGCAGAAAAUCGUCU	chr12:6778252-6778272
42	ＬＡＧ３－４２	UGCUCCAGCGUACACUGUCA	chr12:6775293-6775313
43	ＬＡＧ３－４３	CACCGUGUAGCGGCGGGGCC	chr12:6773773-6773793
44	ＬＡＧ３－４４	ACCGCGCCGCGGUGCACCUC	chr12:6773929-6773949
45	ＬＡＧ３－４５	AGCUUUCCGCUAAGUGGUGA	chr12:6774736-6774756
46	ＬＡＧ３－４６	CUGUGCAUUGGUUCCGGAAC	chr12:6774678-6774698
47	ＬＡＧ３－４７	UGGGGCUCUCCCAGAGCGUU	chr12:6777796-6777816
48	ＬＡＧ３－４８	CUCAGCACCGUGUAGCGGCG	chr12:6773778-6773798
49	ＬＡＧ３－４９	GCUCAGCACCGUGUAGCGGC	chr12:6773779-6773799
50	ＬＡＧ３－５０	CGCCGGCGAGUACCGCGCCG	chr12:6773918-6773938
51	ＬＡＧ３－５１	UGUACGCUGGAGCAGGUUCC	chr12:6775299-6775319
52	ＬＡＧ３－５２	UUGGCAAUGCCAGCUGUACC	chr12:6777432-6777452
53	ＬＡＧ３－５３	UGAUGGGGGGACUCCCGGAC	chr12:6774719-6774739

【表２－４】

配列番号	ＬＡＧ３番号	ガイド配列	ゲノム座標 (hg38)
54	ＬＡＧ３－５４	UUGACAGUGUACGCUGGAGC	chr12:6775292-6775312
55	ＬＡＧ３－５５	CGCGCUCAUCCAGCUGGACG	chr12:6773846-6773866
56	ＬＡＧ３－５６	CGUCCCGCCCCACAUACUCG	chr12:6773998-6774018
57	ＬＡＧ３－５７	CGUACACUGUCAAGGGAGUU	chr12:6775285-6775305
58	ＬＡＧ３－５８	GCGAGAAGUCCCCGCGCUGC	chr12:6773870-6773890
59	ＬＡＧ３－５９	AAGCGUUCUUGUCCAGAUAC	chr12:6777325-6777345
60	ＬＡＧ３－６０	CUCGCCGGCGUCCGCGCGCC	chr12:6773908-6773928
61	ＬＡＧ３－６１	UGGGCGGUCAGGGCGGCUGA	chr12:6774654-6774674
62	ＬＡＧ３－６２	UGUGCAUUGGUUCCGGAACC	chr12:6774679-6774699
63	ＬＡＧ３－６３	CCGCUACACGGUGCUGAGCG	chr12:6773780-6773800
64	ＬＡＧ３－６４	CCGCGCCGCGGUGCACCUCA	chr12:6773930-6773950
65	ＬＡＧ３－６５	GCGCUCAUCCAGCUGGACGC	chr12:6773845-6773865
66	ＬＡＧ３－６６	GAUGAGCGCGGCCGGCAGCG	chr12:6773856-6773876
67	ＬＡＧ３－６７	GUUCAAAAUGACCCAGUCGG	chr12:6774627-6774647
68	ＬＡＧ３－６８	CCCUGAGGUGCACCGCGGCG	chr12:6773933-6773953
69	ＬＡＧ３－６９	ACUCCCUUGACAGUGUACGC	chr12:6775286-6775306
70	ＬＡＧ３－７０	CCAGCCCGGCGCGCGGACGC	chr12:6773901-6773921
71	ＬＡＧ３－７１	ACGCUUUGUGUGGAGCUCUC	chr12:6777339-6777359

【表２－５】

配列番号	ＬＡＧ３番号	ガイド配列	ゲノム座標 (hg38)
72	ＬＡＧ３－７２	UGUGAGGUGACUCCAGUAUC	chr12:6777310-6777330
73	ＬＡＧ３－７３	ACGGUGCUGAGCGUGGGUCC	chr12:6773787-6773807
74	ＬＡＧ３－７４	GUCCCGGAGGCCUGCGCAGC	chr12:6773803-6773823
75	ＬＡＧ３－７５	CAGCCUCUGUGCAUUGGUUC	chr12:6774672-6774692
76	ＬＡＧ３－７６	AACAGUGAGGUUAUACAUGA	chr12:6774840-6774860
77	ＬＡＧ３－７７	CAAGUCAGCCCCAUGGACUC	chr12:6774770-6774790
78	ＬＡＧ３－７８	AUCUCUCAGAGCCUCCGACU	chr12:6774613-6774633
79	ＬＡＧ３－７９	CUCCCGCUGCGCAGGCCUCC	chr12:6773808-6773828
80	ＬＡＧ３－８０	GGGGCAGCCUCCCGCUGCGC	chr12:6773816-6773836
81	ＬＡＧ３－８１	GCUCAAUGCCACUGUCACAU	chr12:6775513-6775533
82	ＬＡＧ３－８２	CUUUCCGCUAAGUGGUGAUG	chr12:6774734-6774754
83	ＬＡＧ３－８３	CUGGACAAGAACGCUUUGUG	chr12:6777329-6777349
84	ＬＡＧ３－８４	CUUUGGGUCACCUGGAUCCC	chr12:6777276-6777296
85	ＬＡＧ３－８５	ACAUACUCGAGGCCUGGCCC	chr12:6773987-6774007
86	ＬＡＧ３－８６	CCCGGACAGGGACUCGGCCC	chr12:6774706-6774726
87	ＬＡＧ３－８７	GGGACUCCCGGACAGGGACU	chr12:6774712-6774732
88	ＬＡＧ３－８８	CGCCAUUGUCUCCAGUCACC	chr12:6775414-6775434

【表３－１】

表２：ＬＡＧ３を標的とするｓｇＲＮＡ配列

ガイド番号	配列番号	sgRNA 配列	ゲノム座標(hg38)
	89	GUUCCGGAACCAAUGCACAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr12:6774678-6774698
G015068	90	GACGUUGAAGCCAUCUCUGUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr12:6774816-6774836
G015069	91	GCGGUCCCUGAGGUGCACCGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr12:6773938-6773958
G015070	92	GCAAUGCCAGCUGUACCAGGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr12:6777435-6777455
G015071	105	AGAGGAAGCUUUCCGCUAAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr12:6774742-6774762
G018433	106	mG*mU*mU*CCGGAACCAAUGCACAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr12:6774678-6774698

【表３－２】

ガイド番号	配列番号	sgRNA配列	ゲノム座標(hg38)
G018434	107	mG*mC*mG*GUCCCUGAGGUGCACCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCm U*m U*m U*mU	chr12:6773938-6773958

*=ＰＳ結合；ｍ＝２’－Ｏ－Ｍｅヌクレオチド；Ｎ＝あらゆる天然または非天然ヌクレオチド

【００９０】

いくつかの実施形態では、本発明は、ヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９などの Ｃａｓヌクレアーゼ）であってもよいＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を、ＬＡＧ３中の標的ＤＮＡ配列に指向させるガイド配列を含む１つ以上のガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含む組成物を提供する。ｇＲＮＡを含むいくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、例えばｓｇＲＮＡとして、表１に示されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、配列番号１～２７、配列番号１～１５、配列番号１～１１、配列番号１～４、または、配列番号１，４、５及び９から選択されるガイド配列を含み得る。ｇＲＮＡは、表１に示されるガイド配列の１７、１８、１９、または２０個の連続ヌクレオチドを含むｃｒＲＮＡを含み得る。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、表１に示されるガイド配列、任意選択で、配列番号１～２７、配列番号１～１５、配列番号１～１１、配列番号１～４、または、配列番号１，４、５及び９の少なくとも１７、１８、１９、または２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、または９５％、または１００％の同一性を有する配列を含むガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、表１に示されるガイド配列、任意選択で、配列番号１～２７、配列番号１～１５、配列番号１～１１、配列番号１～４、または、配列番号１，４、５及び９に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、または９５％、または１００％の同一性を有するガイド配列を含む。ｇＲＮＡは、ｔｒＲＮＡをさらに含み得る。本明細書に記載される各実施形態では、ｇＲＮＡは、単一ＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）として、または別個のＲＮＡ（ｄｇＲＮＡ）上で会合したｃｒＲＮＡ及びｔｒＲＮＡを含んでいてもよい。ｓｇＲＮＡの文脈において、ｃｒＲＮＡ及びｔｒＲＮＡの構成要素は、例えば、ホスホジエステル結合または他の共有結合を介して共有結合され得る。

【００９１】

本明細書に記載される各々の実施形態では、ガイドＲＮＡは、「デュアルガイドＲＮＡ」または「ｄｇＲＮＡ」として２つのＲＮＡ分子を含み得る。ｄｇＲＮＡは、例えば、表１に示されるガイド配列を含むｃｒＲＮＡを含む第１のＲＮＡ分子と、ｔｒＲＮＡを含む第２のＲＮＡ分子と、を含む。第１のＲＮＡ分子及び第２のＲＮＡ分子は共有結合していなくてもよいが、ｃｒＲＮＡ及びｔｒＲＮＡの部分の間の塩基対形成によってＲＮＡ二本鎖を形成してもよい。

【００９２】

本明細書に記載される各々の実施形態では、ガイドＲＮＡは、「単一ガイドＲＮＡ」または「ｓｇＲＮＡ」として単一のＲＮＡ分子を含み得る。ｓｇＲＮＡは、表１に示されるガイド配列、あるいはｔｒＲＮＡに共有結合された、配列番号１～２７、配列番号１～１５、配列番号１～１１、配列番号１～４、または、配列番号１，４、５及び９から選択されるガイド配列を含むｃｒＲＮＡ（もしくはその部分）を含み得る。ｓｇＲＮＡは、表１に示されるガイド配列の１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または

配列番号１～２７、配列番号１～１５、配列番号１～１１、配列番号１～４、または、配列番号１，４、５及び９から選択されるガイド配列を含み得る。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ及びｔｒＲＮＡは、リンカーを介して共有結合される。いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡは、ｃｒＲＮＡとｔｒＲＮＡの部分の間の塩基対形成によって、ステムループ構造を形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ及びｔｒＲＮＡは、ホスホジエステル結合ではない１つ以上の結合を介して共有結合される。

【００９３】

いくつかの実施形態では、ｔｒＲＮＡは、天然に存在するＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系由来のｔｒＲＮＡ配列の全てまたは一部を含み得る。いくつかの実施形態では、ｔｒＲＮＡは、先端切断または修飾された野生型ｔｒＲＮＡを含む。ｔｒＲＮＡの長さは、使用されるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系に依存する。いくつかの実施形態では、ｔｒＲＮＡは、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、または１００個より多いヌクレオチドを含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、ｔｒＲＮＡは、例えば１つ以上のヘアピン構造もしくはステムループ構造、または１つ以上のバルジ構造などの特定の二次構造を含み得る。

【００９４】

いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号１～８８、好ましくは、配列番号１～２７、配列番号１～１５、配列番号１～１１、配列番号１～４、または、配列番号１，４、５及び９のうちのいずれか１つのガイド配列を含む、１つ以上のガイドＲＮＡを含む組成物を提供する。

【００９５】

いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号８９～９２、１０５、１０６、及び１０７のうちのいずれか１つを含む１つ以上のｓｇＲＮＡを含む組成物を提供する。

【００９６】

一態様では、本発明は、配列番号１～８８、好ましくは、配列番号１～２７、配列番号１～１５、配列番号１～１１、配列番号１～４、または、配列番号１，４、５及び９のうちのいずれかと１００％、または少なくとも９５％もしくは９０％同一であるガイド配列を含む、ｇＲＮＡを含む組成物を提供する。

【００９７】

他の実施形態では、組成物は、配列番号１～８８、好ましくは、配列番号１～２７、配列番号１～１５、配列番号１～１１、配列番号１～４、または、配列番号１，４、５及び９の２つ以上のガイド配列から選択される少なくとも１つ、例えば、少なくとも２つのｇＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号１～８８、好ましくは、配列番号１～２７、配列番号１～１５、配列番号１～１１、配列番号１～４、または、配列番号１，４、５及び９の核酸のうちのいずれかと１００％、または少なくとも９５％もしくは９０％同一のガイド配列を各々が含む、少なくとも２つのｇＲＮＡを含む。

【００９８】

本発明のガイドＲＮＡ組成物は、ＬＡＧ３遺伝子内の標的配列を認識する（例えば、それに対してハイブリダイズする）ように設計される。例えば、ＬＡＧ３標的配列は、ガイドＲＮＡを含む提供されるＣａｓ開裂によって認識され、切断され得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えば、Ｃａｓクリベースは、ガイドＲＮＡをＬＡＧ３遺伝子の標的配列に対して指向させてもよく、ガイドＲＮＡのガイド配列は、標的配列とハイブリダイズし、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えば、Ｃａｓクリベースは、標的配列を切断する。

【００９９】

いくつかの実施形態では、１つ以上のガイドＲＮＡの選択は、ＬＡＧ３遺伝子内の標的配列に基づいて決定される。

【０１００】

いかなる特定の理論にも拘束されることなく、遺伝子の特定の領域における変異（例え

ば、ヌクレアーゼ媒介性ＤＳＢの結果として生じるインデル、すなわち挿入または欠失に起因するフレームシフト変異）は、遺伝子の他の領域における変異よりも許容性が低くてもよく、したがって、ＤＳＢの位置は、もたらされ得るタンパク質ノックダウンの量または種類における重要な因子である。いくつかの実施形態では、ＬＡＧ３内の標的配列に対して相補的であるか、または相補性を有するｇＲＮＡは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をＬＡＧ３遺伝子内の特定の位置に指向させるために使用される。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、ＬＡＧ３のエクソン１、エクソン２、エクソン３、エクソン４、エクソン５、エクソン６、エクソン７、またはエクソン８内の標的配列に対して相補的であるか、または相補性を有するガイド配列を有するように設計されている。

【０１０１】

いくつかの実施形態では、ガイド配列は、ヒトＬＡＧ３遺伝子内に存在する標的配列または標的配列の逆相補体と１００％、または少なくとも９５％もしくは９０％同一である。いくつかの実施形態では、標的配列は、ガイドＲＮＡのガイド配列に対して相補的であり得る。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡのガイド配列とそれに対応する標的配列との間の相補性または同一性の程度は、少なくとも８０％、８５％、９０％、もしくは９５％、または１００％であり得る。いくつかの実施形態では、標的配列とｇＲＮＡのガイド配列とは、１００％相補的であるか、または同一であり得る。他の実施形態では、標的配列とｇＲＮＡのガイド配列は、少なくとも１個のミスマッチを含んでいてもよい。例えば、標的配列とｇＲＮＡのガイド配列は、１、２、３、または４個のミスマッチを含んでいてもよく、ここで、ガイド配列の全長は、約２０である。いくつかの実施形態では、標的配列とｇＲＮＡのガイド配列は、１～４個のミスマッチを含んでいてもよく、ここで、ガイド配列は、２０個のヌクレオチドである。

【０１０２】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示の組成物または製剤は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えば、本明細書に記載のＣａｓヌクレアーゼをコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含むｍＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えば、Ｃａｓヌクレアーゼをコードするｏｒｆを含むｍＲＮＡが提供されるか、使用されるか、または投与される。

【０１０３】

Ｂ．修飾ｇＲＮＡ及びｍＲＮＡ

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、化学修飾されている。１つ以上の修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドを含むｇＲＮＡは、標準的なＡ、Ｇ、Ｃ、及びＵ残基の代わりに、またはそれらに加えて使用される１つ以上の非天然または天然に存在する成分または構造の存在を記載するために、「修飾」ｇＲＮＡまたは「化学修飾」ｇＲＮＡと呼ばれる。いくつかの実施形態では、修飾ｇＲＮＡは、非標準的なヌクレオシドまたはヌクレオチドを用いて合成され、本明細書では「修飾された」と呼ばれる。修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドは、（ｉ）ホスホジエステル骨格連結における改変、例えば、非架橋のリン酸酸素の１つもしくは両方、または、架橋リン酸酸素の１つ以上の置き換え（例示的な骨格修飾）、（ｉｉ）リボース糖の成分、例えば、リボース糖の２’ヒドロキシルの改変、例えば、置き換え（例示的な糖修飾）、（ｉｉｉ）リン酸部分の「脱リン酸型」リンカーによる大規模な置き換え（例示的な骨格修飾）、（ｉｖ）非標準的な核酸塩基によるものを含め、天然に存在する核酸塩基の修飾または置き換え（例示的な塩基修飾）、（ｖ）リボースリン酸骨格の置き換えまたは修飾（例示的な骨格修飾）、（ｖｉ）オリゴヌクレオチドの３’末端または５’末端の修飾、例えば、末端リン酸基の除去、修飾もしくは置き換え、または部分、キャップ、もしくはリンカーのコンジュゲーション（そのような３’または５’のキャップ修飾は、糖及び／または骨格の修飾を含み得る）、ならびに（ｖｉｉ）糖の修飾または置き換え（例示的な糖修飾）の１つ以上を含み得る。

【０１０４】

上に列挙されるものなどの化学修飾を組み合わせて、２、３、４、またはそれ以上の修飾を有し得るヌクレオシド及びヌクレオチド（まとめて「残基」）を含む修飾ｇＲＮＡま

たはｍＲＮＡを提供することができる。例えば、修飾残基は、修飾糖及び修飾核酸塩基を有し得る。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡの各々の塩基は修飾され、例えば、全ての塩基がホスホロチオエートなどの修飾リン酸基を有する。特定の実施形態では、ｇＲＮＡ分子のリン酸基の全て、または実質的に全てがホスホロチオエート基によって置き換えられる。いくつかの実施形態では、修飾ｇＲＮＡは、ＲＮＡの５’末端において、またはその近傍において少なくとも１つの修飾残基を含む。いくつかの実施形態では、修飾ｇＲＮＡは、ＲＮＡの３’末端において、またはその近傍において少なくとも１つの修飾残基を含む。

【０１０５】

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、１、２、３、またはそれ以上の修飾残基を含む。いくつかの実施形態では、修飾ｇＲＮＡ内の位置の少なくとも５％（例えば、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％）が、修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドである。

【０１０６】

非修飾核酸は、例えば、細胞内ヌクレアーゼまたは血清中に見られるものによる分解を受けやすい場合がある。例えば、ヌクレアーゼは核酸のホスホジエステル結合を加水分解し得る。したがって、一態様において、本明細書に記載されるｇＲＮＡは、例えば、細胞内または血清に由来するヌクレアーゼに対する安定性を導入するために、１つ以上の修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾ｇＲＮＡ分子は、インビボとエクスビボの両方において細胞集団に導入されるとき、低減した自然免疫応答を示し得る。「自然免疫応答」という用語は、サイトカイン（特にインターフェロン）発現及び放出の誘導及び細胞死を含む、一本鎖核酸を含む外来性核酸に対する細胞応答を含む。

【０１０７】

骨格修飾のいくつかの実施形態では、修飾された残基のリン酸基は、１つ以上の酸素を異なる置換基によって代置することによって修飾され得る。さらに、修飾残基、例えば修飾核酸中に存在する修飾残基は、本明細書において記載されるように、非修飾リン酸部分の修飾リン酸基による大規模な置き換えを含み得る。いくつかの実施形態では、リン酸骨格の骨格修飾は、帯電していないリンカーまたは非対称な電荷分布を有する帯電したリンカーのいずれかをもたらす改変を含み得る。

【０１０８】

修飾されたリン酸基の例には、ホスホロチオエート、ホスホロセレネート、ボラノホスフェート、ボラノホスフェートエステル、水素ホスホネート、ホスホロアミデート、アルキルまたはアリールホスホネート、及びホスホトリエステルが挙げられる。非修飾リン酸基中のリン酸原子は、アキラルである。しかしながら、非架橋酸素のうちの１つの、上述の原子または原子群のうちの１つによる置き換えは、リン原子をキラルにすることができる。立体リン原子は、「Ｒ」配置（本明細書においてＲｐ）または「Ｓ」配置（本明細書においてＳｐ）のいずれかを有し得る。骨格は、架橋酸素（すなわち、リン酸をヌクレオシドに連結する酸素）の、窒素（架橋ホスホロアミデート）、硫黄（架橋ホスホロチオエート）、及び炭素（架橋メチレンホスホネート）による置き換えによってもまた修飾できる。置き換えは、いずれかの架橋酸素または両方の架橋酸素において生じ得る。

【０１０９】

リン酸基は、特定の主鎖修飾において、非リン含有連結基によって置き換えることができる。いくつかの実施形態では、帯電したリン酸基は、中性部分によって置き換えることができる。リン酸基を置き換えることのできる部分の例は、非限定的に、例えば、メチルホスホン酸、ヒドロキシルアミノ、シロキサン、カーボネート、カルボキシメチル、カルバメート、アミド、チオエーテル、エチレンオキシドリンカー、スフホネート、スルホン

アミド、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ（ｍｅｔｈｙｌｅｎｅｈｙｄｒａｚｏ）、メチレンジメチルヒドラゾ（ｍｅｔｈｙｌｅｎｅｄｉｍｅｔｈｙｌｈｙｄｒａｚｏ）、メチレンオキシメチルイミノ（ｍｅｔｈｙｌｅｎｅｏｘｙｍｅｔｈｙｌｉｍｉｎｏ）を含み得る。

【０１１０】

リン酸リンカー及びリボース糖が、ヌクレアーゼ耐性ヌクレオシドまたはヌクレオチドの代替物によって置き換えられている、核酸を模倣することができる足場もまた構築できる。そのような修飾は、骨格及び糖修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、核酸塩基は、代替骨格によって係留され得る。例は、非限定的に、モルホリノ、シクロブチル、ピロリジン、及びペプチド核酸（ＰＮＡ）ヌクレオシド代替物を含み得る。

【０１１１】

修飾ヌクレオシド及び修飾ヌクレオチドは、糖基に対する１つ以上の修飾、すなわち糖修飾を含み得る。例えば、２’ヒドロキシル基（ＯＨ）は、修飾されていてもよく、例えば、多くの異なる「オキシ」または「デオキシ」置換基によって置き換えることができる。いくつかの実施形態では、２’ヒドロキシル基に対する修飾は、ヒドロキシルが２’－アルコキシドイオンを形成するように脱プロトン化されることがもはや起こり得ないため、核酸の安定性を増強し得る。

【０１１２】

２’ヒドロキシル基修飾の例は、アルコキシまたはアリールオキシ（ＯＲ、式中「Ｒ」がアルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、または糖であり得る）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、Ｏ（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_n$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＯＲであって式中Ｒが、例えば、Ｈまたは任意選択で置換されたアルキルであり、ｎが０～２０の整数であり得るもの（例えば、０～４、０～８、０～１０、０～１６、１～４、１～８、１～１０、１～１６、１～２０、２～４、２～８、２～１０、２～１６、２～２０、４～８、４～１０、４～１６、及び４～２０）を含み得る。いくつかの実施形態では、２’ヒドロキシル基修飾は、２’－Ｏ－Ｍｅであり得る。いくつかの実施形態では、２’ヒドロキシル基修飾は、２’－ヒドロキシル基をフッ素で置き換える２’－フルオロ修飾であり得る。いくつかの実施形態では、２’ヒドロキシル基修飾は、２’ヒドロキシルが、例えばＣ$_{1-6}$アルキレンまたはＣ$_{1-6}$ヘテロアルキレン架橋を介して同一のリボース糖の４’炭素へと接続し得る「ロックド」核酸（ＬＮＡ）を含んでいてもよく、例示的な架橋としては、メチレン、プロピレン、エーテル、またはアミノ架橋、Ｏ－アミノ（ここで、アミノは、例えば、ＮＨ$_2$、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、もしくはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、もしくはポリアミノであり得る）、及びアミノアルコキシ、Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$－アミノ（ここで、アミノは、例えば、ＮＨ$_2$、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、もしくはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、もしくはポリアミノであり得る）を含み得る。いくつかの実施形態では、２’ヒドロキシル基修飾は、リボース環がＣ２’－Ｃ３’結合を欠失している「アンロックド（ｕｎｌｏｃｋｅｄ）」核酸（ＵＮＡ）を含み得る。いくつかの実施形態では、２’ヒドロキシル基修飾は、メトキシエチル基（ＭＯＥ）、（ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＯＣＨ$_3$、例えば、ＰＥＧ誘導体）を含み得る。

【０１１３】

「デオキシ」２’修飾は、水素（すなわち、デオキシリボース糖、例えば、部分的なｄｓＲＮＡの突出部分）、ハロ（例えば、ブロモ、クロロ、フルオロ、またはヨード）、アミノ（ここでアミノは、例えば、ＮＨ$_2$、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、またはアミノ酸であり得る）、ＮＨ（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＮＨ）$_n$ＣＨ２ＣＨ$_2$－アミノ（ここでアミノは、例えば、本明細書において記載されるようなものである）、－ＮＨＣ（Ｏ）Ｒ（ここでＲは、例えば、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、または糖であり得る）、シアノ、メルカプト、アルキル－チオ－アルキ

ル、チオアルコキシ、ならびにアルキル、シクロアルキル、アリール、アルケニル及びアルキニルを含み得、任意選択で、例えば本明細書において記載されるようなアミノによって置換されていてもよい。

【０１１４】

糖修飾は、１つ以上の炭素を含み、リボースにおける対応する炭素のものとは反対の立体化学配置を有する糖基を含み得る。したがって、修飾核酸は、糖として例えばアラビノースを含むヌクレオチドを含み得る。修飾核酸はまた、脱塩基糖をも含み得る。これらの脱塩基糖はまた、構成要素の糖原子の１つ以上においてさらに修飾され得る。修飾核酸はまた、Ｌ型である１つ以上の糖、例えばＬ－ヌクレオシドを含み得る。

【０１１５】

修飾核酸に組み込むことのできる本明細書に記載される修飾ヌクレオシド及び修飾ヌクレオチドは、核酸塩基とも呼ばれる修飾塩基を含み得る。核酸塩基の例は、アデニン（Ａ）、グアニン（Ｇ）、シトシン（Ｃ）、及びウラシル（Ｕ）を含むが、これらに限定されない。これらの核酸塩基は、修飾されて、または完全に置き換えられて、修飾核酸に組み込むことのできる修飾残基をもたらすことができる。ヌクレオチドの核酸塩基は、独立して、プリン、ピリミジン、プリン類似体、またはピリミジン類似体から選択することができる。いくつかの実施形態では、核酸塩基は、例えば、天然に存在する塩基、及び塩基の合成誘導体を含み得る。

【０１１６】

デュアルガイドＲＮＡを用いる実施形態において、ｃｒＲＮＡとｔｒａｃｒＲＮＡの各々は、修飾を含み得る。このような修飾は、ｃｒＲＮＡまたはｔｒａｃｒＲＮＡの一方または両方の末端に存在してもよい。ｓｇＲＮＡを含む実施形態では、ｓｇＲＮＡの一方または両方の末端における１つ以上の残基が化学修飾され得るか、または内部ヌクレオシドが修飾され得るか、またはｓｇＲＮＡ全体が化学修飾され得る。特定の実施形態は、５’末端修飾を含む。特定の実施形態は、３’末端修飾を含む。特定の実施形態は、５’末端修飾及び３’末端修飾を含む。

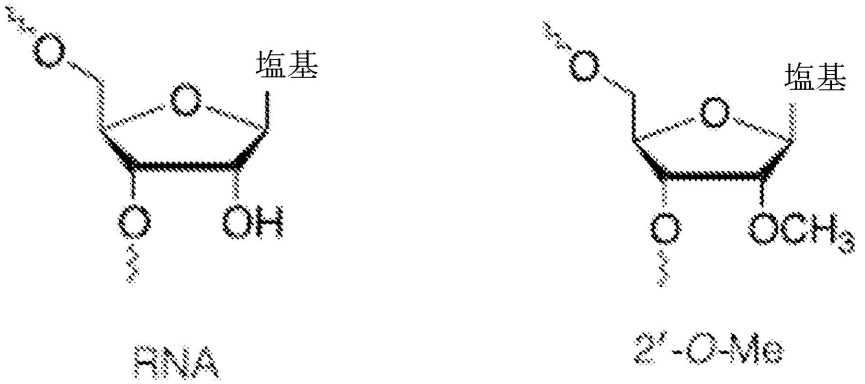
【０１１７】

いくつかの実施形態では、本明細書において開示されるガイドＲＮＡは、２０１７年１２月８日に出願された「Ｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ　Ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｇｕｉｄｅ　ＲＮＡｓ」という発明の名称のＷＯ２０１８／１０７０２８（Ａ１）に開示された修飾パターンの１つを含み、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本明細書において開示されるガイドＲＮＡは、ＵＳ２０１７０１１４３３４号に開示された構造／修飾パターンの１つを含み、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本明細書において開示されるガイドＲＮＡは、ＷＯ２０１７／１３６７９４に開示された構造／修飾パターンのうちの１つを含み、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

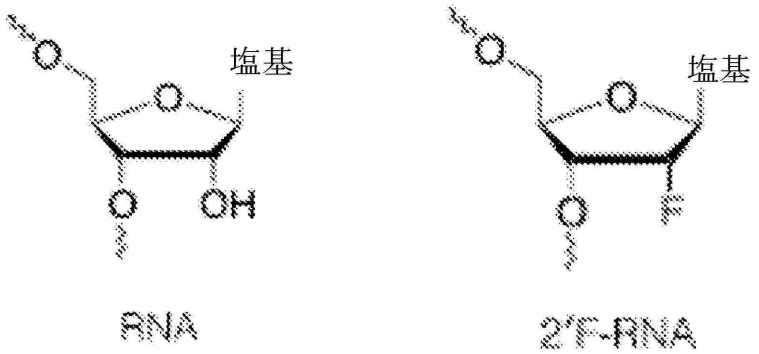
【０１１８】

いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡは、本明細書に示される修飾パターンのうちのいずれかを含み、ここでＮは、任意の天然または非天然ヌクレオチドであり、Ｎの全体は、例えば、表１で本明細書に記載されるＬＡＧ３ガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、修飾ｓｇＲＮＡは、以下の配列：ｍＮ＊ｍＮ＊ｍＮ＊ＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＧＵＵＵＵＡＧＡｍＧｍＣｍＵｍＡｍＧｍＡｍＡｍＡｍＵｍＡｍＧｍＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡｍＡｍＣｍＵｍＵｍＧｍＡｍＡｍＡｍＡｍＡｍＧｍＵｍＧｍＧｍＣｍＡｍＣｍＣｍＧｍＡｍＧｍＵｍＣｍＧｍＧｍＵｍＧｍＣｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵ（配列番号３００）を含み、ここで「Ｎ」は、任意の天然または非天然ヌクレオチドであってもよく、Ｎの全体は、例えば、表１に記載されるＬＡＧ３ガイド配列を含む。例えば、Ｎは、表１に本明細書で開示されるガイド配列のうちのいずれかで置き換えられ、任意選択で、Ｎは、配列番号１～８８、または配列番号１～２７、配列番号１～１５、配列番号１～１１、配列番号１～４、または配列番号１、４、５及び９で置き換えられる。

【０１１９】
以下に記載される修飾のいずれも、本明細書に記載されるｇＲＮＡ及びｍＲＮＡ内に存在し得る。
【０１２０】
「ｍＡ」、「ｍＣ」、「ｍＵ」、または「ｍＧ」という用語は、２’－Ｏ－Ｍｅで修飾されたヌクレオチドを表すために使用され得る。
【０１２１】
２’－Ｏ－メチルの修飾は、以下のように描写され得る。
【化２】



【０１２２】
ヌクレオチド糖環に影響を及ぼすことが示されている別の化学修飾は、ハロゲン置換である。例えば、ヌクレオチド糖環上の２’－フルオロ（２’－Ｆ）置換は、オリゴヌクレオチド結合親和性及びヌクレアーゼ安定性を増加させることができる。
【０１２３】
本出願では、「ｆＡ」、「ｆＣ」、「ｆＵ」、または「ｆＧ」という用語を使用して、２’－Ｆで置換されたヌクレオチドを表すことができる。
【０１２４】
２’－Ｆの置換は、以下のように描写され得る。
【化３】



ＲＮＡの天然組成物　　２Ｆ’置換

【０１２５】
ホスホロチオエート（ＰＳ）連結または結合とは、ホスホジエステル連結、例えばヌク

レオチド塩基間の結合での１個の非架橋リン酸酸素を硫黄が置換する結合を指す。ホスホロチオエートを使用してオリゴヌクレオチドを生成する場合、修飾オリゴヌクレオチドは、Ｓ－オリゴとも称され得る。

【０１２６】

ＰＳ修飾を示すために、「＊」を使用し得る。本出願では、用語Ａ＊、Ｃ＊、Ｕ＊、またはＧ＊を使用して、ＰＳ結合で隣りの（例えば、３’）ヌクレオチドに連結されているヌクレオチドを示すことができる。

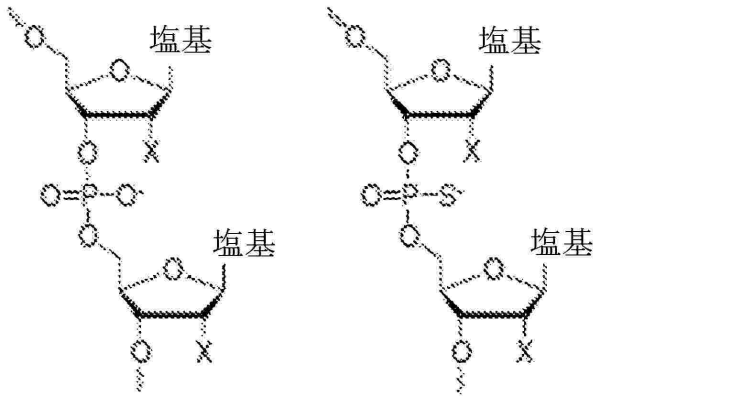
【０１２７】

本出願では、「ｍＡ＊」、「ｍＣ＊」、「ｍＵ＊」、または「ｍＧ＊」という用語を使用して、２’－Ｏ－Ｍｅで置換され、ＰＳ結合で次の（例えば３’）ヌクレオチドに連結されているヌクレオチドを示すことができる。

【０１２８】

以下の図は、ホスホジエステル結合の代わりにＰＳ結合を生じる、非架橋リン酸酸素へのＳ－の置換を示す。

【化４】



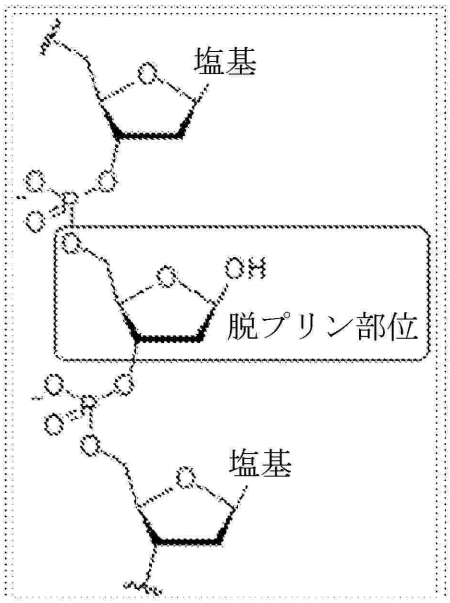
ホスホジエステル　ホスホロチオエート（ＰＳ）

ＲＮＡの天然ホスホジエステル連結　修飾ホスホロチオエート（ＰＳ）結合

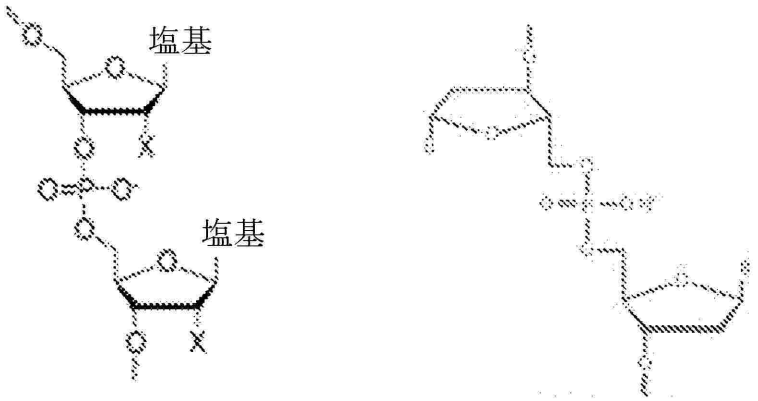
【０１２９】

脱塩基ヌクレオチドは、窒素系塩基を欠いているものを指す。以下の図は、塩基を欠く脱塩基（脱プリンとしても知られる）部位を有するオリゴヌクレオチドを描写する。

【化５】



【０１３０】
反転した塩基は、通常の５’から３’への連結から反転した連結を有するものを指す（すなわち、５’から５’への連結または３’から３’への連結のいずれか）。例えば、
【化６】



天然オリゴヌクレオチド連結　　反転オリゴヌクレオチド連結

【０１３１】
脱塩基ヌクレオチドは、反転した連結と結合することができる。例えば、脱塩基ヌクレオチドは、５’から５’連結を介して末端５’ヌクレオチドに結合してもよいし、または脱塩基ヌクレオチドは、３’から３’連結を介して末端３’ヌクレオチドに結合してもよい。末端５’または３’ヌクレオチドのいずれかにおける反転した脱塩基ヌクレオチドはまた、反転した脱塩基末端キャップと称され得る。
【０１３２】

いくつかの実施形態では、５’末端部における最初の３、４、または５個のヌクレオチドのうちの１つ以上、及び３’末端部における最後の３、４、または５個のヌクレオチドのうちの１つ以上が修飾されている。いくつかの実施形態では、修飾は、２’－Ｏ－Ｍｅ、２’－Ｆ、反転した脱塩基ヌクレオチド、ＰＳ結合、または安定性もしくは性能を増加させることが当該技術分野において周知の他のヌクレオチド修飾である。

【０１３３】

いくつかの実施形態では、５’末端部における最初の４個のヌクレオチド、及び３’末端部における最後の４個のヌクレオチドは、ホスホロチオエート（ＰＳ）結合を用いて連結される。

【０１３４】

いくつかの実施形態では、５’末端部における最初の３個のヌクレオチド、及び３’末端部における最後の３個のヌクレオチドは、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、５’末端部における最初の３個のヌクレオチド、及び３’末端部における最後の３個のヌクレオチドは、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、５’末端部における最初の３個のヌクレオチド、及び３’末端部における最後の３個のヌクレオチドは、反転した脱塩基ヌクレオチドを含む。

【０１３５】

いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡは、修飾ｓｇＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡは、ｍＮ＊ｍＮ＊ｍＮ＊ＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＧＵＵＵＵＡＧＡｍＧｍＣｍＵｍＡｍＧｍＡｍＡｍＡｍＵｍＡｍＧｍＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡｍＡｍＣｍＵｍＵｍＧｍＡｍＡｍＡｍＡｍＡｍＧｍＵｍＧｍＧｍＣｍＡｍＣｍＣｍＧｍＡｍＧｍＵｍＣｍＧｍＧｍＵｍＧｍＣｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵ（配列番号３００）に示される修飾パターンを含み、ここでＮは、任意の天然または非天然ヌクレオチドであり、Ｎの全体は、ＬＡＧ３内の標的配列に対してヌクレアーゼを指向させるガイド配列（例えば、表１に示されるゲノム座標）を含む。

【０１３６】

いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡは、配列番号１～８８のガイド配列のうちのいずれか１つを含むｓｇＲＮＡ及びｓｇＲＮＡの保存された部分、例えば、例示的なＳｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ－１として示されるｓｇＲＮＡの保存された部分、または表２及び本明細書全体で示されるｇＲＮＡの保存された部分を含む。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡは、配列番号１～８８のガイド配列及びＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵＵＵＵ（配列番号２０２）のヌクレオチドのうちのいずれか１つを含むｓｇＲＮＡを含み、ここでヌクレオチドは、ガイド配列の３’末端にあり、ｓｇＲＮＡは、本明細書または配列ｍＮ＊ｍＮ＊ｍＮ＊ＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＧＵＵＵＵＡＧＡｍＧｍＣｍＵｍＡｍＧｍＡｍＡｍＡｍＵｍＡｍＧｍＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡｍＡｍＣｍＵｍＵｍＧｍＡｍＡｍＡｍＡｍＡｍＧｍＵｍＧｍＧｍＣｍＡｍＣｍＣｍＧｍＡｍＧｍＵｍＣｍＧｍＧｍＵｍＧｍＣｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵ（配列番号３００）に示されるように修飾され得る。いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡは、本明細書で提供される例示的なＳｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ－１及びその修飾バージョン、またはＮの全体が、標的配列にヌクレアーゼを指向させるガイド配列を含む、以下の表２Ｂに提供されるバージョンを含む。各Ｎは、独立して、修飾されているか、または非修飾である。特定の実施形態では、修飾の表示がない場合、ヌクレオチドは、非修飾ＲＮＡヌクレオチド残基、すなわち、リボース糖及びホスホジエステル骨格である。

【表４】

表２Ｂ：例示的なｓｇＲＮＡ配列（修飾及び非修飾バージョン）

ガイド足場 (非修飾/修飾)	sgRNA 非修飾配列	sgRNA 修飾配列
81/181	(N)20GUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCACGAAAG GGCACCGAGUCGGUGC (配列番号 401)	mN*mN*mN*(N)17GUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCACGA AAGGGCACCGAGUCGG*mU* mG*mC (配列番号 402)
94/194	(N)20GUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAACUUGG CACCGAGUCGGUGC (配列番号 403)	mN*mN*mN*(N)17GUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAACU UGGCACCGAGUCGG*mU*mG *mC (配列番号 404)
95/195	(N)20GUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAACUUGG CACCGAGUCGGUGC (配列番号 405)	mN*mN*mN*(N)17GUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAACU UGGCACCGAGUCGG*mU*mG *mC (配列番号 406)
871/971	(N)20GUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCACGAAAG GGCACCGAGUCGGUGC (配列番号 407)	mN*mN*mN*(N)17mGUUUfUA GmAmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCmAmAGUfUmA fAmAfAmUAmAmGmGmCmU mAGUmCmCGUfUAmUmCAm CmGmAmAmAmGmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmCmGm G*mU*mG*mC (配列番号 408)
872/972	(N)20GUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCACGAAAG GGCACCGAGUCGGUGC (配列番号 409)	mN*mN*mN*(N)17GUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCACGA AAGGGCACCGAGUCGG*mU* mG*mC (配列番号 410)

【０１３７】

上述のように、いくつかの実施形態では、本明細書において開示される組成物または製剤は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えば、本明細書に記載のＣａｓヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓ９ヌクレアーゼをコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含むｍＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えば、Ｃａｓヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓ９ヌクレアーゼをコードするＯＲＦを含むｍＲＮＡが提供されるか、使用されるか、または投与される。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼをコードするＯＲＦは、「修飾ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤ＯＲＦ」または単に「修飾ＯＲＦ」であり、ＯＲＦが修飾されていることを示すための略語として使用

される。

【０１３８】

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡまたは修飾ＯＲＦは、少なくとも１つ、複数、または全てのウリジン位置に、修飾ウリジンを含み得る。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、例えば、ハロゲン、メチル、またはエチルで、５位で修飾されたウリジンである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、例えば、ハロゲン、メチル、またはエチルで、１位で修飾されたプソイドウリジンである。修飾ウリジンは、例えば、プソイドウリジン、Ｎ１－メチル－プソイドウリジン、５－メトキシウリジン、５－ヨードウリジン、またはそれらの組み合わせであり得る。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、５－メトキシウリジンである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、５－ヨードウリジンである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、プソイドウリジンである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、Ｎ１－メチル－プソイドウリジンである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、プソイドウリジンとＮ１－メチル－プソイドウリジンの組み合わせである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、プソイドウリジンと５－メトキシウリジンの組み合わせである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、Ｎ１－メチルプソイドウリジンと５－メトキシウリジンの組み合わせである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、５－ヨードウリジンとＮ１－メチル－プソイドウリジンの組み合わせである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、プソイドウリジンと５－ヨードウリジンの組み合わせである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、５－ヨードウリジンと５－メトキシウリジンの組み合わせである。

【０１３９】

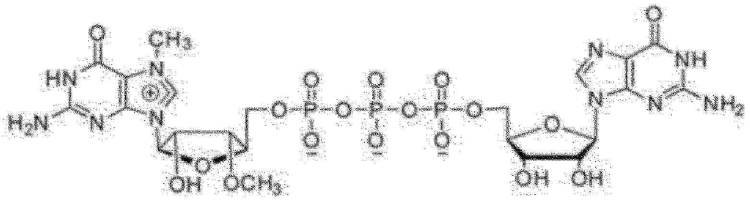
いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｍＲＮＡは、５’キャップ、例えば、Ｃａｐ０、Ｃａｐ１、またはＣａｐ２を含む。５’キャップは、一般に、ｍＲＮＡの５’－３’鎖の第１のヌクレオチド（すなわち、第１のキャップ近位のヌクレオチド）の５’位に対して５’－トリホスフェートを介して連結した７－メチルグアニンリボヌクレオチド（例えば、ＡＲＣＡに関して、以下に考察されるようにさらに修飾されてもよい）である。Ｃａｐ０において、ｍＲＮＡの第１及び第２のキャップ近位のヌクレオチドのリボースは、両方とも、２’－ヒドロキシルを含む。Ｃａｐ１において、ｍＲＮＡの第１及び第２の転写ヌクレオチドのリボースは、それぞれ、２’－メトキシ及び２’－ヒドロキシを含む。Ｃａｐ２において、ｍＲＮＡの第１及び第２のキャップ近位のヌクレオチドのリボースは、両方とも、２’－メトキシを含む。例えば、Ｋａｔｉｂａｈ ｅｔ ａｌ．（２０１４）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ１１１（３３）：１２０２５－３０、Ａｂｂａｓ ｅｔ ａｌ．（２０１７）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ １１４（１１）：Ｅ２１０６－Ｅ２１１５を参照のこと。ヒトｍＲＮＡなどの哺乳動物ｍＲＮＡを含む、ほとんどの内因性の高級真核生物ｍＲＮＡは、Ｃａｐ１またはＣａｐ２を含む。Ｃａｐ０、及びＣａｐ１及びＣａｐ２とは異なる他のキャップ構造は、ＩＦＩＴ－１及びＩＦＩＴ－５などの自然免疫系の構成要素によって「非自己」として認識されるため、ヒトなどの哺乳動物において免疫原性である場合があり、Ｉ型インターフェロンを含むサイトカインレベルの上昇を引き起こし得る。ＩＦＩＴ－１及びＩＦＩＴ－５などの自然免疫系の構成要素はまた、Ｃａｐ１またはＣａｐ２以外のキャップとのｍＲＮＡの結合についてｅＩＦ４Ｅと競合する場合があり、ｍＲＮＡの翻訳を潜在的に阻害する。

【０１４０】

キャップは、共転写的に含めることができる。例えば、ＡＲＣＡ（抗逆キャップ類似体、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃカタログ番号ＡＭ８０４５）は、グアニンリボヌクレオチドの５’位に連結する７－メチルグアニン３’－メトキシ－５’－トリホスフェートを含むキャップ類似体であり、開始時にインビトロで転写産物に組み込むことができる。ＡＲＣＡは、第１のキャップ近位のヌクレオチドの２’位がヒドロキシルであるＣａｐ０キャップをもたらす。例えば、Ｓｔｅｐｉｎｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，（２００１）“Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ ｏｆ ｍＲＮＡｓ ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ｔｈｅ ｎｏｖｅｌ‘ａｎｔｉ－ｒｅｖｅｒｓｅ’ｃａｐ ａｎａｌ

ｏｇｓ　７－ｍｅｔｈｙｌ（３’－Ｏ－ｍｅｔｈｙｌ）ＧｐｐｐＧ　ａｎｄ　７－ｍｅｔｈｙｌ（３’ｄｅｏｘｙ）ＧｐｐｐＧ，”ＲＮＡ７：１４８６－１４９５を参照のこと。ＡＲＣＡの構造を以下に示す。

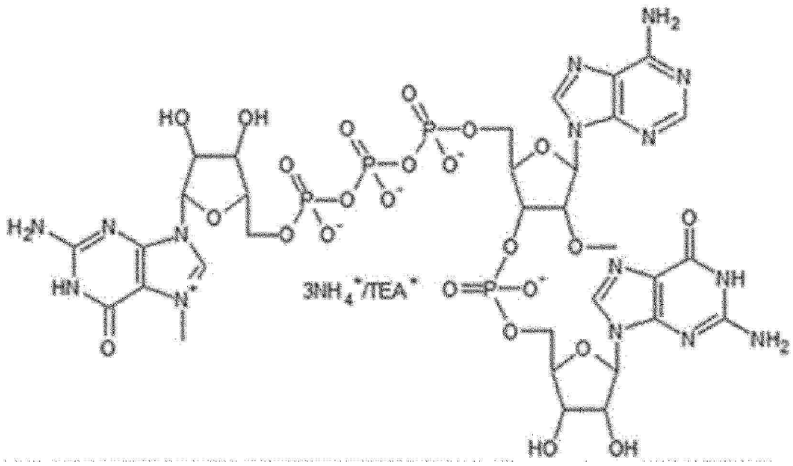
【化７】



【０１４１】

ＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＡＧ（ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧ、ＴｒｉＬｉｎｋ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓカタログ番号Ｎ－７１１３）またはＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＧＧ（ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＧ）ｐＧ、ＴｒｉＬｉｎｋ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓカタログ番号Ｎ－７１３３）を使用して、Ｃａｐ１構造を共転写的に提供することができる。ＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＡＧ及びＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＧＧの３’－Ｏ－メチル化態様も、それぞれ、カタログ番号Ｎ－７４１３及びＮ－７４３３としてＴｒｉＬｉｎｋ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから入手可能である。ＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＡＧの構造を以下に示す。

【化８】



【０１４２】

あるいは、転写後に、キャップをＲＮＡに付加することができる。例えば、Ｖａｃｃｉｎｉａキャッピング酵素は市販されており（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓカタログ番号Ｍ２０８０Ｓ）、そのＤ１サブユニットによって与えられるＲＮＡトリホスファターゼ及びグアニリルトランスフェラーゼ活性、ならびにそのＤ１２サブユニットによって与えられるグアニンメチルトランスフェラーゼを有する。したがって、Ｓ－アデノシルメチオニン及びＧＴＰの存在下で、Ｃａｐ０を与えるように、７－メチルグアニンをＲＮＡに付加することができる。例えば、Ｇｕｏ，Ｐ．ａｎｄ　Ｍｏｓｓ，Ｂ．（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８７，４０２３－４０２７、Ｍａｏ，Ｘ．ａｎｄ　Ｓｈｕｍａｎ，Ｓ．（１９９４）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９、２４４７２－２４４７９を参照のこと。

【０１４３】
いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、ポリアデニル化（ポリ－Ａ）テールをさらに含む。いくつかの実施形態では、ポリ－Ａテールは、少なくとも２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、または１００個のアデニンを含み、任意選択で、３００個までのアデニンを含む。いくつかの実施形態では、ポリ－Ａテールは、９５、９６、９７、９８、９９、または１００個のアデニンヌクレオチドを含む。
【０１４４】
Ｃ．リボ核タンパク質複合体
いくつかの実施形態では、表１からの１つ以上のガイド配列を含む１つ以上のｇＲＮＡ、または表２からの１つ以上のｓｇＲＮＡ、及びＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えば、ヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓ９を含む組成物を包含する。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、クリベース活性を有し、これは二本鎖エンドヌクレアーゼ活性とも称され得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、Ｃａｓヌクレアーゼを含む。Ｃａｓ９ヌクレアーゼの例としては、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ、Ｓ．ａｕｒｅｕｓ、及び他の原核生物のＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ系のもの（例えば、次の段落のリストを参照のこと）、ならびにそれらの修飾（例えば、操作型または変異体）態様が挙げられる。例えば、ＵＳ２０１６０３１２１９８、ＵＳ２０１６０３１２１９９を参照のこと。Ｃａｓヌクレアーゼの他の例としては、ＩＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ系のＣｓｍもしくはＣｍｒ複合体、またはそのＣａｓ１０、Ｃｓｍ１、もしくはＣｍｒ２サブユニット、及びＩ型ＣＲＩＳＰＲ系のカスケード複合体、またはそのＣａｓ３サブユニットが挙げられる。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、ＩＩＡ型、ＩＩＢ型、またはＩＩＣ型の系に由来していてもよい。様々なＣＲＩＳＰＲ系及びＣａｓヌクレアーゼの考察については、例えば、Ｍａｋａｒｏｖａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．９：４６７－４７７（２０１１）、Ｍａｋａｒｏｖａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ，１３：７２２－３６（２０１５）、Ｓｈｍａｋｏｖ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ，６０：３８５－３９７（２０１５）を参照のこと。
【０１４５】
Ｃａｓヌクレアーゼの由来となり得る非限定的な例示的な種としては、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ、Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｉｎｎｏｃｕａ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｇａｓｓｅｒｉ、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｎｏｖｉｃｉｄａ、Ｗｏｌｉｎｅｌｌａ ｓｕｃｃｉｎｏｇｅｎｅｓ、Ｓｕｔｔｅｒｅｌｌａ ｗａｄｓｗｏｒｔｈｅｎｓｉｓ、Ｇａｍｍａｐｒｏｔｅｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ、Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ ｍｕｌｔｏｃｉｄａ、Ｆｉｂｒｏｂａｃｔｅｒ ｓｕｃｃｉｎｏｇｅｎｅ、Ｒｈｏｄｏｓｐｉｒｉｌｌｕｍ ｒｕｂｒｕｍ、Ｎｏｃａｒｄｉｏｐｓｉｓ ｄａｓｓｏｎｖｉｌｌｅｉ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｐｒｉｓｔｉｎａｅｓｐｉｒａｌｉｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｖｉｒｉｄｏｃｈｒｏｍｏｇｅｎｅｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｖｉｒｉｄｏｃｈｒｏｍｏｇｅｎｅｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｓｐｏｒａｎｇｉｕｍ ｒｏｓｅｕｍ、Ｓｔｒｅｐｔｏｓｐｏｒａｎｇｉｕｍ ｒｏｓｅｕｍ、Ａｌｉｃｙｃｌｏｂａｃｉｌｌｕｓ ａｃｉｄｏｃａｌｄａｒｉｕｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｐｓｅｕｄｏｍｙｃｏｉｄｅｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｅｌｅｎｉｔｉｒｅｄｕｃｅｎｓ、Ｅｘｉｇｕｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｓｉｂｉｒｉｃｕｍ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｓａｌｉｖａｒｉｕｓ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｂｕｃｈｎｅｒｉ、Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｄｅｎｔｉｃｏｌａ、Ｍｉｃｒｏｓｃｉｌｌａ ｍａｒｉｎａ、Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａｌｅｓ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｐｏｌａｒｏｍｏｎａｓ ｎａｐｈｔｈａｌｅｎｉｖｏｒａｎｓ、Ｐｏｌａｒｏｍｏｎａｓ ｓｐ．、Ｃｒｏｃｏｓｐｈａｅｒａ ｗａｔｓｏｎｉｉ、Ｃｙａｎｏｔｈｅｃｅ ｓｐ．、Ｍｉｃｒｏｃｙｓｔｉｓ ａｅｒｕ

ginosa、Synechococcus sp.、Acetohalobium arabaticum、Ammonifex degensii、Caldicelulosiruptor becsciii、Candidatus Desulforudis、Clostridium botulinum、Clostridium difficile、Finegoldia magna、Natranaerobius thermophilus、Pelotomaculum thermopropionicum、Acidithiobacillus caldus、Acidithiobacillus ferrooxidans、Allochromatium vinosum、Marinobacter sp.、Nitrosococcus halophilus、Nitrosococcus watsoni、Pseudoalteromonas haloplanktis、Ktedonobacter racemifer、Methanohalobium evestigatum、Anabaena variabilis、Nodularia spumigena、Nostoc sp.、Arthrospira maxima、Arthrospira platensis、Arthrospira sp.、Lyngbya sp.、Microcoleus chthonoplastes、Oscillatoria sp.、Petrotoga mobilis、Thermosipho africanus、Streptococcus pasteurianus、Neisseria cinerea、Campylobacter lari、Parvibaculum lavamentivorans、Corynebacterium diphtheria、Acidaminococcus sp.、Lachnospiraceae bacterium ND2006、及びAcaryochloris marinaが挙げられる。

【0146】

いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、Streptococcus pyogenes由来のCas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、Streptococcus thermophilus由来のCas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、Neisseria meningitidis由来のCas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、Staphylococcus aureus由来のCas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、Francisella novicida由来のCpf1ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、Acidaminococcus sp.由来のCpf1ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、Lachnospiraceae bacterium ND2006由来のCpf1ヌクレアーゼである。さらなる実施形態において、Casヌクレアーゼは、Francisella tularensis、Lachnospiraceae bacterium、Butyrivibrio proteoclasticus、Peregrinibacteria bacterium、Parcubacteria bacterium、Smithella、Acidaminococcus、Candidatus Methanoplasma termitum、Eubacterium eligens、Moraxella bovoculi、Leptospira inadai、Porphyromonas crevioricanis、Prevotella disiens、またはPorphyromonas macacae由来のCpf1ヌクレアーゼである。特定の実施形態では、Casヌクレアーゼは、AcidaminococcusまたはLachnospiraceae由来のCpf1ヌクレアーゼである。

【0147】

いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤とともに含むgRNAは、リボ核タンパク質複合体（RNP）と呼ばれる。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤は、Casヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼとともに含むgRNAは、Cas RNPと呼ばれる。いくつかの実施形態では、RNPは

、Ｉ型、ＩＩ型、またはＩＩＩ型の構成要素を含む。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系由来のＣａｓ９タンパク質である。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９とともに含むｇＲＮＡは、Ｃａｓ９　ＲＮＰと呼ばれる。

【０１４８】

野生型Ｃａｓ９は、２つのヌクレアーゼドメイン、ＲｕｖＣ及びＨＮＨを有する。ＲｕｖＣドメインは、非標的ＤＮＡ鎖を切断し、ＨＮＨドメインは、ＤＮＡの標的鎖を切断する。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９タンパク質は、２つ以上のＲｕｖＣドメインまたは２つ以上のＨＮＨドメインを含む。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９タンパク質は、野生型Ｃａｓ９である。組成物、使用及び方法の実施形態の各々において、Ｃａｓは、標的ＤＮＡにおける二本鎖切断を誘導する。

【０１４９】

いくつかの実施形態において、キメラＣａｓヌクレアーゼが使用され、タンパク質の１つのドメインまたは領域が、異なるタンパク質の一部によって置き換えられている。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼドメインは、Ｆｏｋ１などの異なるヌクレアーゼ由来のドメインで置き換えられてもよい。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、修飾ヌクレアーゼであってもよい。

【０１５０】

他の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、Ｉ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系由来であり得る。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、Ｉ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系のカスケード複合体の構成要素であり得る。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、Ｃａｓ３タンパク質であり得る。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系由来であり得る。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、ＲＮＡ切断活性を有し得る。

【０１５１】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、一本鎖ニッカーゼ活性を有し、すなわち、１つのＤＮＡ鎖を切断して一本鎖切断（「ニック」としても知られる）を生成することができる。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、Ｃａｓニッカーゼを含む。ニッカーゼは、ｄｓＤＮＡ内でニックを作製する酵素であり、すなわち、ＤＮＡ二重らせんの一方の鎖を切断するが、他方の鎖を切断しない。いくつかの実施形態では、Ｃａｓニッカーゼは、例えば、触媒ドメイン内の１つ以上の改変（例えば、点変異）によって、エンドヌクレオチド分解活性部位が不活性化されたＣａｓヌクレアーゼ（例えば、上で考察されるＣａｓヌクレアーゼ）の一態様である。例えば、Ｃａｓニッカーゼ及び例示的な触媒ドメイン改変の考察については、米国特許第８，８８９，３５６号を参照のこと。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９ニッカーゼなどのＣａｓニッカーゼは、不活性化されたＲｕｖＣまたはＨＮＨドメインを有する。

【０１５２】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１つの機能的ヌクレアーゼドメインのみを含有するように修飾される。例えば、薬剤タンパク質は、その核酸切断活性を低減させるために、ヌクレアーゼドメインの１つが変異されるか、または完全もしくは部分的に欠失するように修飾されてもよい。いくつかの実施形態では、活性が低減したＲｕｖＣドメインを有するニッカーゼが使用される。いくつかの実施形態では、不活性なＲｕｖＣドメインを有するニッカーゼが使用される。いくつかの実施形態では、活性が低減したＨＮＨドメインを有するニッカーゼが使用される。いくつかの実施形態では、不活性なＨＮＨドメインを有するニッカーゼが使用される。

【０１５３】

いくつかの実施形態では、Ｃａｓタンパク質ヌクレアーゼドメイン内の保存アミノ酸は、ヌクレアーゼ活性を低減または改変させるように置換される。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、ＲｕｖＣまたはＲｕｖＣ様ヌクレアーゼドメイン内にアミノ酸置換を含み得る。ＲｕｖＣまたはＲｕｖＣ様ヌクレアーゼドメインにおける例示的なアミノ酸置換としては、Ｄ１０Ａ（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９タンパク質に基づく）が

挙げられる。例えば、Ｚｅｔｓｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）Ｃｅｌｌ　Ｏｃｔ　２２：１６３（３）：７５９－７７１を参照のこと。いくつかの実施形態では、ＣａｓヌクレアーゼはＨＮＨまたはＨＮＨ様ヌクレアーゼドメイン内にアミノ酸置換を含み得る。ＨＮＨまたはＨＮＨ様ヌクレアーゼドメインにおける例示的なアミノ酸置換としては、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８６３Ａ、Ｈ９８３Ａ、及びＤ９８６Ａ（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９タンパク質に基づく）が挙げられる。例えば、Ｚｅｔｓｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）を参照のこと。さらなる例示的なアミノ酸置換としては、Ｄ９１７Ａ、Ｅ１００６Ａ、及びＤ１２５５Ａ（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｎｏｖｉｃｉｄａ　Ｕ１１２　Ｃｐｆ１（ＦｎＣｐｆ１）配列（ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ－Ａ０Ｑ７Ｑ２（ＣＰＦ１＿ＦＲＡＴＮ）に基づく）が挙げられる。

【０１５４】

いくつかの実施形態では、ニッカーゼをコードするｍＲＮＡは、それぞれ、標的配列のセンス鎖及びアンチセンス鎖に対して相補的な一対のガイドＲＮＡと組み合わせて提供される。この実施形態では、ガイドＲＮＡは、標的配列の反対側の鎖にニックを生成することによって（すなわち、ダブルニッキング）、ニッカーゼを標的配列に指向させ、ＤＳＢを導入する。いくつかの実施形態では、ダブルニッキングの使用は、特異性を改善し、オフターゲット効果を低減し得る。いくつかの実施形態では、ニッカーゼは、ＤＮＡの反対側の鎖を標的とする２つの別個のガイドＲＮＡとともに使用され、標的ＤＮＡ内にダブルニックを産生する。いくつかの実施形態では、ニッカーゼは、ごく接近した位置にあるように選択された２つの別個のガイドＲＮＡとともに使用され、標的ＤＮＡ内にダブルニックを産生する。

【０１５５】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、クリベース及びニッカーゼ活性を欠いている。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、ｄＣａｓ　ＤＮＡ結合ポリペプチドを含む。ｄＣａｓポリペプチドは、触媒（クリベース／ニッカーゼ）活性を本質的に欠く一方で、ＤＮＡ結合活性を有する。いくつかの実施形態において、ｄＣａｓポリペプチドは、ｄＣａｓ９ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、クリベース活性及びニッカーゼ活性を欠くＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、またはｄＣａｓ　ＤＮＡ結合ポリペプチドは、例えば、その触媒ドメイン内の１つ以上の改変（例えば、点変異）によって、そのエンドヌクレオチド分解活性部位が不活性化されたＣａｓヌクレアーゼ（例えば、上述のＣａｓヌクレアーゼ）の一態様である。例えば、ＵＳ２０１４０１８６９５８、ＵＳ２０１５０１６６９８０を参照のこと。

【０１５６】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１つ以上の異種機能ドメインを含む（例えば、融合ポリペプチドであるか、または融合ポリペプチドを含む）。

【０１５７】

いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の細胞核への輸送を促進し得る。例えば、異種機能ドメインは、核局在化シグナル（ＮＬＳ）であり得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１～１０個のＮＬＳと融合され得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１～５個のＮＬＳと融合され得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１個のＮＬＳと融合され得る。１個のＮＬＳが使用される場合、ＮＬＳは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の配列のＮ末端部またはＣ末端部で連結され得る。これをＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の配列内に挿入することもできる。他の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、２個以上のＮＬＳと融合され得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、２、３、４、または５個のＮＬＳと融合され得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、２個のＮＬＳと融合され得る。特定の状況では、２個のＮＬＳは、同じ（例えば、２個のＳＶ４０　ＮＬＳ）であってもよく、または異なっていてもよい。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、カルボキシ末端部で連結された２個のＳＶ４０　ＮＬＳの配列に融合される。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ

結合剤は、２個のＮＬＳと融合していてもよく、１つはＮ末端部に連結しており、１つはＣ末端部に連結している。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、３個のＮＬＳと融合され得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、ＮＬＳなしで融合され得る。いくつかの実施形態では、ＮＬＳは、単節型配列、例えば、ＳＶ４０　ＮＬＳ、ＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号９６）またはＰＫＫＫＲＲＶ（配列番号９７）であってもよい。いくつかの実施形態では、ＮＬＳは、双節型配列、例えば、ヌクレオプラスミンのＮＬＳであるＫＲＰＡＡＴＫＫＡＧＱＡＫＫＫＫ（配列番号９８）であってもよい。特定の実施形態では、単一のＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号９６）ＮＬＳは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤のＣ末端部で連結され得る。１つ以上のリンカーは、任意選択で、融合部位に含まれる。

【０１５８】

いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の細胞内半減期を修正することが可能であり得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の半減期が増加し得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の半減期が低減し得る。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の安定性を増加させることができる。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の安定性を低減させることができる。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、タンパク質分解のシグナルペプチドとして機能し得る。いくつかの実施形態では、タンパク質分解は、例えば、プロテアソーム、リソソームプロテアーゼ、またはカルパインプロテアーゼなどのタンパク質分解酵素によって媒介され得る。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、ＰＥＳＴ配列を含み得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、ユビキチンまたはポリユビキチン鎖の付加によって修飾され得る。いくつかの実施形態では、ユビキチンは、ユビキチン様タンパク質（ＵＢＬ）であってもよい。ユビキチン様タンパク質の非限定的な例としては、小さなユビキチン様修飾因子（ＳＵＭＯ）、ユビキチン交差反応性タンパク質（ＵＣＲＰ、インターフェロン刺激遺伝子－１５（ＩＳＧ１５）としても知られる）、ユビキチン関連修飾因子－１（ＵＲＭ１）、神経前駆細胞が発現する発達的に下方制御されたタンパク質－８（ＮＥＤＤ８、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅにおいてＲｕｂ１とも呼ばれる）、ヒト白血球抗原Ｆ関連（ＦＡＴ１０）、オートファジー－８（ＡＴＧ８）及び－１２（ＡＴＧ１２）、Ｆａｕユビキチン様タンパク質（ＦＵＢ１）、膜固定ＵＢＬ（ＭＵＢ）、ユビキチン折りたたみ修飾因子－１（ＵＦＭ１）、及びユビキチン様タンパク質－５（ＵＢＬ５）が挙げられる。

【０１５９】

いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、マーカードメインであってもよい。マーカードメインの非限定的な例としては、蛍光タンパク質、精製タグ、エピトープタグ、及びレポーター遺伝子配列が挙げられる。いくつかの実施形態では、マーカードメインは、蛍光タンパク質であってもよい。好適な蛍光タンパク質の非限定的な例としては、緑色蛍光タンパク質（例えば、ＧＦＰ、ＧＦＰ－２、ｔａｇＧＦＰ、ｔｕｒｂｏＧＦＰ、ｓｆＧＦＰ、ＥＧＦＰ、Ｅｍｅｒａｌｄ、Ａｚａｍｉ　Ｇｒｅｅｎ、Ｍｏｎｏｍｅｒｉｃ　Ａｚａｍｉ　Ｇｒｅｅｎ、ＣｏｐＧＦＰ、ＡｃｅＧＦＰ、ＺｓＧｒｅｅｎ１）、黄色蛍光タンパク質（例えば、ＹＦＰ、ＥＹＦＰ、Ｃｉｔｒｉｎｅ、Ｖｅｎｕｓ、ＹＰｅｔ、ＰｈｉＹＦＰ、ＺｓＹｅｌｌｏｗ１）、青色蛍光タンパク質（例えば、ＥＢＦＰ、ＥＢＦＰ２、Ａｚｕｒｉｔｅ、ｍＫａｌａｍａｌ、ＧＦＰｕｖ、Ｓａｐｐｈｉｒｅ、Ｔ－ｓａｐｐｈｉｒｅ）、シアン蛍光タンパク質（例えば、ＥＣＦＰ、Ｃｅｒｕｌｅａｎ、ＣｙＰｅｔ、ＡｍＣｙａｎ１、Ｍｉｄｏｒｉｉｓｈｉ－Ｃｙａｎ）、赤色蛍光タンパク質（例えば、ｍＫａｔｅ、ｍＫａｔｅ２、ｍＰｌｕｍ、ＤｓＲｅｄ単量体、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｍＲＦＰ１、ＤｓＲｅｄ－Ｅｘｐｒｅｓｓ、ＤｓＲｅｄ２、ＤｓＲｅｄ－Ｍｏｎｏｍｅｒ、ＨｃＲｅｄ－Ｔａｎｄｅｍ、ＨｃＲｅｄ１、ＡｓＲｅｄ２、ｅｑＦＰ６１１、ｍＲａｓｂｅｒｒｙ、ｍＳｔｒａｗｂｅｒｒｙ、Ｊｒｅｄ）、及び橙色蛍光タンパク質（ｍＯｒａｎｇｅ、ｍＫＯ、Ｋｕｓａｂｉｒａ－Ｏｒａｎｇｅ、Ｍｏｎｏｍｅｒｉｃ　Ｋｕｓａｂｉｒａ－Ｏｒａ

ｎｇｅ、ｍＴａｎｇｅｒｉｎｅ、ｔｄＴｏｍａｔｏ）、または任意の他の適切な蛍光タンパク質が挙げられる。他の実施形態では、マーカードメインは、精製タグまたはエピトープタグであってもよい。非限定的な例示的なタグとしては、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、キチン結合タンパク質（ＣＢＰ）、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、チオレドキシン（ＴＲＸ）、ポリ（ＮＡＮＰ）、タンデムアフィニティ精製（ＴＡＰ）タグ、ｍｙｃ、ＡｃＶ５、ＡＵ１、ＡＵ５、Ｅ、ＥＣＳ、Ｅ２、ＦＬＡＧ、ＨＡ、ｎｕｓ、Ｓｏｆｔａｇ　１、Ｓｏｆｔａｇ　３、Ｓｔｒｅｐ、ＳＢＰ、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ、ＨＳＶ、ＫＴ３、Ｓ、Ｓ１、Ｔ７、Ｖ５、ＶＳＶ－Ｇ、６ｘＨｉｓ、８ｘＨｉｓ、ビオチンカルボキシル担体タンパク質（ＢＣＣＰ）、ポリ－Ｈｉｓ、及びカルモジュリンが挙げられる。非限定的な例示的なレポーター遺伝子としては、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）、β－ガラクトシダーゼ、β－グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、または蛍光タンパク質が挙げられる。

【０１６０】

追加の実施形態では、異種機能ドメインは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を特異的なオルガネラ、細胞型、組織、または臓器に標的化し得る。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をミトコンドリアに標的化し得る。

【０１６１】

さらなる実施形態では、異種機能ドメインは、エフェクタードメインであってもよい。ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤がその標的配列に指向されるとき、例えば、ＣａｓヌクレアーゼがｇＲＮＡによって標的配列に指向されるとき、エフェクタードメインは、標的配列を修飾するか、または影響を及ぼし得る。いくつかの実施形態では、エフェクタードメインは、核酸結合ドメイン、ヌクレアーゼドメイン（例えば、非Ｃａｓヌクレアーゼドメイン）、エピジェネティック修飾ドメイン、転写活性化ドメイン、または転写抑制ドメインから選択され得る。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、ヌクレアーゼ、例えばＦｏｋＩヌクレアーゼである。例えば、米国特許第９，０２３，６４９号を参照のこと。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、転写活性化因子または転写抑制因子である。例えば、Ｑｉ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｒｅｐｕｒｐｏｓｉｎｇ　ＣＲＩＳＰＲ　ａｓ　ａｎ　ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ　ｐｌａｔｆｏｒｍ　ｆｏｒ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ｃｏｎｔｒｏｌ　ｏｆ　ｇｅｎｅ　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ，”Ｃｅｌｌ　１５２：１１７３－８３（２０１３）、Ｐｅｒｅｚ－Ｐｉｎｅｒａ　ｅｔ　ａｌ．，“ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ　ｇｅｎｅ　ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ　ｂｙ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９－ｂａｓｅｄ　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　ｆａｃｔｏｒｓ，”Ｎａｔ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　１０：９７３－６（２０１３）、Ｍａｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，“ＣＡＳ９　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎａｌ　ａｃｔｉｖａｔｏｒｓ　ｆｏｒ　ｔａｒｇｅｔ　ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ　ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ　ａｎｄ　ｐａｉｒｅｄ　ｎｉｃｋａｓｅｓ　ｆｏｒ　ｃｏｏｐｅｒａｔｉｖｅ　ｇｅｎｏｍｅ　ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，”Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３１：８３３－８（２０１３）、Ｇｉｌｂｅｒｔ　ｅｔ　ａｌ．，“ＣＲＩＳＰＲ－ｍｅｄｉａｔｅｄ　ｍｏｄｕｌａｒ　ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ　ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　ｉｎ　ｅｕｋａｒｙｏｔｅｓ，”Ｃｅｌｌ　１５４：４４２－５１（２０１３）を参照のこと。したがって、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、本質的に、ガイドＲＮＡを使用して所望の標的配列に結合するように指向され得る転写因子になる。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、デアミナーゼ、例えばシチジンデアミナーゼまたはアデニンデアミナーゼである。特定の実施形態では、異種機能ドメインは、アポリポタンパク質Ｂ　ｍＲＮＡ編集酵素（ＡＰＯＢＥＣ）デアミナーゼなどのＣ－Ｔ塩基変換子（シチジンデアミナーゼ）である。

【０１６２】

Ｄ．ｇＲＮＡの有効性の決定

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡの有効性は、送達されたとき、またはＲＮＰを形成する他の構成要素とともに発現されたときに決定される。いくつかの実施形態では、ｇＲ

ＮＡは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えば、Ｃａｓタンパク質、例えば、Ｃａｓ９とともに発現される。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓヌクレアーゼまたはニッカーゼ、例えば、Ｃａｓ９ヌクレアーゼまたはニッカーゼを既に安定に発現する細胞株に送達されるか、またはその細胞株において発現される。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、ＲＮＰの一部として細胞に送達される。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓヌクレアーゼまたはニッカーゼ、例えば、Ｃａｓ９ヌクレアーゼまたはニッカーゼをコードするｍＲＮＡとともに細胞に送達される。

【０１６３】

本明細書に記載される場合、本明細書に開示されるＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼ及びガイドＲＮＡの使用は、ＤＮＡにおいて二本鎖切断を生じる場合があり、細胞機構による修復時に挿入／欠失（インデル）変異の形態でエラーを生じ得る。インデルに起因する多くの変異は、リーディングフレームを改変するか、または未成熟終止コドンを導入し、したがって、非機能性タンパク質を産生する。いくつかの実施形態では、特定のｇＲＮＡの有効性は、インビトロモデルに基づいて決定される。いくつかの実施形態では、インビトロモデルは、Ｃａｓ９を安定して発現するＨＥＫ２９３細胞である（ＨＥＫ２９３＿Ｃａｓ９）。いくつかの実施形態では、インビトロモデルは、末梢血単核細胞（「ＰＢＭＣ」）である。いくつかの実施形態では、インビトロモデルは、一次ヒトＴ細胞などのＴ細胞である。一次細胞を使用することに関して、市販の一次ヒト肝細胞を使用して、実験間のより高い一貫性を提供することができる。いくつかの実施形態では、インビトロモデルにおいて（例えば、Ｔ細胞において）欠失または挿入が起こるオフターゲット部位の数は、例えば、インビトロでＣａｓ９　ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡでトランスフェクトされた細胞からゲノムＤＮＡを分析することによって決定される。いくつかの実施形態では、そのような決定は、インビトロでＣａｓ９　ｍＲＮＡ、ガイドＲＮＡ、及びドナーオリゴヌクレオチドでトランスフェクトされた細胞由来のゲノムＤＮＡを分析することを含む。そのような決定のための例示的な手順を、ＨＥＫ２９３細胞、ＰＢＭＣ、及びヒトＣＤ３$^{+}$Ｔ細胞を使用する作業実施例に提供する。

【０１６４】

いくつかの実施形態では、特定のｇＲＮＡの有効性は、ｇＲＮＡ選択プロセスのための複数のインビトロ細胞モデルにわたって決定される。いくつかの実施形態では、選択されたｇＲＮＡとのデータの細胞株比較が行われる。いくつかの実施形態では、複数の細胞モデルで交差スクリーニングを実施する。

【０１６５】

いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、ＬＡＧ３のインデルパーセントまたは遺伝子修飾パーセントによって測定される。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、ＬＡＧ３遺伝子座におけるインデルパーセントまたは遺伝子修飾パーセントによって測定される。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、表１または表２のゲノム座標におけるＬＡＧ３のインデルパーセントまたは遺伝子修飾パーセントによって測定される。いくつかの実施形態では、ＬＡＧ３の編集パーセントを、ＬＡＧ３タンパク質産物のノックダウンを達成するために必要なインデルまたは遺伝子修飾のパーセントと比較する。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、ＬＡＧ３タンパク質の発現の低減または排除によって測定される。実施形態では、当該ＬＡＧ３タンパク質の発現の低減または排除は、例えば、本明細書に記載されるようなフローサイトメトリーによって測定されるようなものである。

【０１６６】

いくつかの実施形態では、ＬＡＧ３タンパク質発現は、本明細書に開示される方法及び組成物を使用して、細胞集団において低減または排除される。いくつかの実施形態では、細胞集団は、非修飾細胞集団に対してフローサイトメトリーによって測定される場合、少なくとも５５％、６０％、６５％、７０％、８０％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％のＬＡＧ３陰性である。

【０１６７】
「非修飾細胞」（または「非修飾細胞（複数）」）は、実験または試験における同じタイプの細胞の対照細胞（または細胞（複数））を指し、「非修飾」対照細胞は、ＬＡＧ３ガイドと接触していない。したがって、非修飾細胞（または細胞（複数））は、ガイドＲＮＡと接触していない細胞、またはＬＡＧ３を標的としないガイドＲＮＡと接触している細胞であり得る。
【０１６８】
いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、標的細胞型のゲノム内のオフターゲット配列におけるインデルまたは遺伝子修飾の数または頻度によって測定される。いくつかの実施形態では、細胞集団において、または標的部位におけるインデル生成の頻度に対して、非常に低い頻度（例えば、＜５％）で、オフターゲット部位でインデルを生成する有効なガイドＲＮＡが提供される。したがって、本開示は、標的細胞型（例えば、Ｔ細胞）においてオフターゲットインデル形成を示さないか、または細胞集団において、または標的部位でのインデル生成の頻度に対して、オフターゲットインデル形成の頻度が５％未満であるガイドＲＮＡを提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、標的細胞型（例えば、Ｔ細胞）において任意のオフターゲットインデル形成を示さないガイドＲＮＡを提供する。いくつかの実施形態では、例えば、本明細書に記載される１つ以上の方法によって評価される場合、５個未満のオフターゲット部位においてインデルを生成するガイドＲＮＡが提供される。いくつかの実施形態では、例えば、本明細書に記載される１つ以上の方法によって評価される場合、４、３、２、または１個未満または以下のオフターゲット部位（複数可）においてインデルを生成するガイドＲＮＡが提供される。いくつかの実施形態では、オフターゲット部位（複数可）は、標的細胞（例えば、肝細胞）ゲノム内のタンパク質コード領域内では発生しない。
【０１６９】
いくつかの実施形態では、遺伝子編集事象を検出すること、例えば、挿入／欠失（「インデル」）変異の形成、及び標的ＤＮＡにおける挿入または相同性誘導修復（ＨＤＲ）事象は、タグ化プライマーを用いた線形増幅及びタグ化増幅産物の単離を利用する（本明細書ではこれ以降、「ＬＡＭ－ＰＣＲ」または「線形増幅（ＬＡ）」法と称される）。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、遺伝子の発現されたタンパク質産物を含む機能的タンパク質複合体のレベルによって測定される。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、編集された細胞の生体集団がＴＣＲの喪失について分析されるＴＣＲ発現のフローサイトメトリー分析によって測定される。
【０１７０】
Ｅ．Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）
いくつかの実施形態では、例えば、ＬＡＧ３をコードする内因性核酸配列の遺伝子修飾を含む操作された細胞または細胞集団は、ＴＣＲ遺伝子配列（複数可）をコードする内因性核酸配列（例えば、ＴＲＡＣまたはＴＲＢＣ）の修飾、例えば、ノックダウンをさらに含む。
【０１７１】
いくつかの実施形態では、ＬＡＧ３をコードする内因性核酸配列の遺伝子修飾（例えば、ノックダウン）、及び標的化受容体をコードする異種配列（複数可）の細胞への挿入を含む、操作された細胞または細胞集団は、ＴＣＲ遺伝子配列（複数可）をコードする内因性核酸配列（例えば、ＴＲＡＣまたはＴＲＢＣ）の修飾（例えば、ノックダウン）をさらに含む。
【０１７２】
一般に、ＴＣＲは、２つのＴＣＲポリペプチド鎖、α及びβを含有するヘテロ二量体受容体分子である。ノックダウンを標的とするための好適なα及びβゲノム配列または遺伝子座は、当該技術分野において既知である。いくつかの実施形態では、操作されたＴ細胞は、ＴＣＲ　α鎖遺伝子配列、例えば、ＴＲＡＣの修飾、例えば、ノックダウンを含む。例えば、ＮＣＢＩ　Ｇｅｎｅ　ＩＤ：２８７５５；Ｅｎｓｅｍｂｌ：ＥＮＳＧ００００００

２７７７３４（Ｔ細胞受容体アルファ定数）、ＵＳ２０１８／０３６２９７５及びＷＯ２０２００８１６１３を参照のこと。

【０１７３】

いくつかの実施形態では、操作された細胞または細胞集団は、ＬＡＧ３をコードする内因性核酸配列の遺伝子修飾、ＴＣＲ遺伝子配列（複数可）をコードする内因性核酸配列（例えば、ＴＲＡＣまたはＴＲＢＣ）の遺伝子修飾（例えば、ノックダウン）、及びＭＨＣクラスＩ遺伝子（例えば、Ｂ２ＭまたはＨＬＡ－Ａ）の修飾（例えば、ノックダウン）を含む。いくつかの実施形態において、ＭＨＣクラスＩ遺伝子は、ＨＬＡ－Ｂ遺伝子またはＨＬＡ－Ｃ遺伝子である。

【０１７４】

いくつかの実施形態では、操作された細胞または細胞集団は、ＬＡＧ３をコードする内因性核酸配列の遺伝子修飾、及びＴＣＲ遺伝子配列（複数可）をコードする内因性核酸配列（例えば、ＴＲＡＣまたはＴＲＢＣ）の遺伝子修飾（例えば、ノックダウン）、及びＭＨＣクラスＩＩ遺伝子（例えば、ＣＩＩＴＡ）の遺伝子修飾（例えば、ノックダウン）を含む。

【０１７５】

いくつかの実施形態では、操作された細胞または細胞集団は、ＬＡＧ３をコードする内因性核酸配列の修飾、ＴＣＲ遺伝子配列（複数可）をコードする内因性核酸配列（例えば、ＴＲＡＣまたはＴＲＢＣ）の遺伝子修飾（例えば、ノックダウン）、及びチェックポイント阻害剤遺伝子（例えば、ＴＩＭ３、２Ｂ４、またはＰＤ－１）の遺伝子修飾（例えば、ノックダウン）を含む。

【０１７６】

いくつかの実施形態では、操作された細胞または細胞集団は、シークエンシング、例えば、ＮＧＳによって評価されるＬＡＧ３遺伝子の遺伝子修飾を含み、細胞の少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、好ましくは少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％が、内因性ＬＡＧ３配列における挿入、欠失、または置換を含む。いくつかの実施形態では、集団内の細胞の少なくとも５０％は、内因性ＬＡＧ３配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む。いくつかの実施形態では、集団内の細胞の少なくとも５５％は、内因性ＬＡＧ３配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む。いくつかの実施形態では、集団内の細胞の少なくとも６０％は、内因性ＬＡＧ３配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む。いくつかの実施形態では、集団内の細胞の少なくとも６５％は、内因性ＬＡＧ３配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む。いくつかの実施形態では、集団内の細胞の少なくとも７０％は、内因性ＬＡＧ３配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む。いくつかの実施形態では、集団内の細胞の少なくとも７５％は、内因性ＬＡＧ３配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む。いくつかの実施形態では、集団内の細胞の少なくとも８５％は、内因性ＬＡＧ３配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む。いくつかの実施形態では、集団内の細胞の少なくとも７０％は、内因性ＬＡＧ３配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む。いくつかの実施形態では、集団内の細胞の少なくとも９０％は、内因性ＬＡＧ３配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む。いくつかの実施形態では、集団内の細胞の少なくとも９５％は、内因性ＬＡＧ３配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む。いくつかの実施形態では、ＬＡＧ３は、例えば、ＬＡＧ３遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、好ましくは少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは９９％、またはアッセイの検出限界未満まで減少する。いくつかの実施形態では、ＬＡＧ３の発現は、例えば、ＬＡＧ３遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも５０％、またはアッセイの検出限界未満まで減少する。いくつかの実施形態では、ＬＡＧ３の発現は、例えば、ＬＡＧ３遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも５５％、また

はアッセイの検出限界未満まで減少する。いくつかの実施形態では、ＬＡＧ３の発現は、例えば、ＬＡＧ３遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも６０％、またはアッセイの検出限界未満まで減少する。いくつかの実施形態では、ＬＡＧ３の発現は、例えば、ＬＡＧ３遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも６５％、またはアッセイの検出限界未満まで減少する。いくつかの実施形態では、ＬＡＧ３の発現は、例えば、ＬＡＧ３遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも７０％、またはアッセイの検出限界未満まで減少する。いくつかの実施形態では、ＬＡＧ３の発現は、例えば、ＬＡＧ３遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも８０％、またはアッセイの検出限界未満まで減少する。いくつかの実施形態では、ＬＡＧ３の発現は、例えば、ＬＡＧ３遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも９０％、またはアッセイの検出限界未満まで減少する。いくつかの実施形態では、ＬＡＧ３の発現は、例えば、ＬＡＧ３遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも９５％、またはアッセイの検出限界未満まで減少する。ＬＡＧ３タンパク質及びｍＲＮＡ発現のアッセイは、当該技術分野において既知である。

【０１７７】

いくつかの実施形態では、操作された細胞または細胞集団は、例えば、シークエンシング、例えば、ＮＧＳによって評価される、遺伝子編集によるＴＣＲ遺伝子配列の修飾（例えば、ノックダウン）を含み、細胞の少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、好ましくは少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％が、内因性ＴＣＲ遺伝子配列における挿入、欠失、または置換を含む。いくつかの実施形態では、ＴＣＲは、例えば、ＴＣＲ遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、好ましくは少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、またはアッセイの検出限界未満まで減少する。特定の実施形態では、ＴＣＲは、ＴＲＡＣまたはＴＲＢＣである。ＴＣＲタンパク質及びｍＲＮＡ発現のアッセイは、当該技術分野において既知である。

【０１７８】

いくつかの実施形態では、操作された細胞または細胞集団は、遺伝子編集によって、例えば、シークエンシング（例えば、ＮＧＳ）によって評価される、遺伝子編集によって標的化受容体をコードする配列（複数可）の挿入を含む。

【０１７９】

いくつかの実施形態では、ＴＣＲ遺伝子内の部位、例えば、ＴＲＡＣ遺伝子を特異的に標的とするガイドＲＮＡを使用して、ＴＣＲ遺伝子の修飾（例えば、ノックダウン）を提供する。

【０１８０】

いくつかの実施形態では、ＴＣＲ遺伝子は、Ｔ細胞において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤とともにガイドＲＮＡを使用して修飾（例えば、ノックダウン）される。いくつかの実施形態では、例えば、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系）とともにガイドＲＮＡを使用して、Ｔ細胞のＴＣＲ遺伝子内で切断（例えば、二本鎖切断（ＤＳＢ）または一本鎖切断（ニック））を誘導することによって操作されたＴ細胞が本明細書に開示される。方法は、インビトロまたはエクスビボで、例えば、免疫応答を抑制するための細胞産物の製造において使用され得る。

【０１８１】

いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡは、ＴＣＲ遺伝子内の本明細書に記載の部位において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤（例えば、Ｃａｓヌクレアーゼ）による標的特異的切断を媒介する。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡは、当該領域に結合する、または結合することができるガイド配列を含むことが理解されるであろう。

【０１８２】

ＩＩＩ．治療方法及び使用、ならびに操作された細胞または免疫療法試薬を調製する方法を含む方法及び使用

本明細書に開示されるｇＲＮＡならびに関連する方法及び組成物は、操作された細胞などの免疫療法試薬を作製するのに有用である。

【０１８３】

いくつかの実施形態では、表１のガイド配列を、ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓヌクレアーゼとともに含むｇＲＮＡは、ＤＳＢを誘導し、修復中の非相同性末端結合（ＮＨＥＪ）が、ＬＡＧ３遺伝子内の修飾をもたらす。いくつかの実施形態では、ＮＨＥＪは、ヌクレオチド（複数可）の欠失または挿入を引き起こし、ＬＡＧ３遺伝子におけるフレームシフトまたはナンセンス変異を誘導する。特定の実施形態では、ＴＣＲ配列、例えば、ＴＲＡＣ及びＴＲＢＣを標的とするガイド配列を含むｇＲＮＡもまた、ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓヌクレアーゼとともに、または別個に、細胞に送達され、ＴＣＲ配列内で遺伝子修飾を行い、全長ＴＣＲ配列の発現を阻害する。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、ｓｇＲＮＡである。

【０１８４】

いくつかの実施形態では、対象は、哺乳動物である。いくつかの実施形態では、対象は、ヒトである。いくつかの実施形態では、対象は、非ヒト霊長類である。

【０１８５】

いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡ、組成物、及び製剤は、エクスビボで細胞、例えば、免疫細胞、例えば、ＬＡＧ３遺伝子における遺伝子修飾を有するＴ細胞を産生するために使用される。修飾Ｔ細胞は、ナチュラルキラー（ＮＫ）Ｔ細胞であってもよい。修飾Ｔ細胞は、ユニバーサルＴＣＲまたは修飾ＴＣＲなどのＴ細胞受容体を発現し得る。Ｔ細胞は、ゼータ鎖シグナル伝達モチーフを有するＣＡＲまたはＣＡＲ構築物を発現し得る。

【０１８６】

ｇＲＮＡ組成物の送達

脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）は、ヌクレオチド及びタンパク質カーゴの送達のための周知の手段であり、エクスビボ及びインビトロでの本明細書に開示されるガイドＲＮＡ及び組成物の送達に使用されてもよい。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、核酸、タンパク質、または核酸をタンパク質とともに送達する。

【０１８７】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に開示される細胞または細胞集団のうちのいずれか１つを対象に送達するための方法を含み、ｇＲＮＡは、ＬＮＰを介して送達される。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡ／ＬＮＰはまた、Ｃａｓ９またはＣａｓ９をコードするｍＲＮＡと会合する。

【０１８８】

いくつかの実施形態では、本発明は、開示されるｇＲＮＡ及びＬＮＰのうちのいずれか１つを含む組成物を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、Ｃａｓ９またはＣａｓ９をコードするｍＲＮＡをさらに含む。

【０１８９】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｇＲＮＡと会合するＬＮＰは、疾患または障害を治療するための医薬として細胞を調製する際に使用するためのものである。

【０１９０】

エレクトロポレーションは、カーゴの送達のための周知の手段であり、本明細書に開示されるｇＲＮＡのうちのいずれか１つの送達のために、任意のエレクトロポレーション方法論が使用され得る。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーションは、本明細書に開示されるｇＲＮＡ及びＣａｓ９またはＣａｓ９をコードするｍＲＮＡのうちのいずれか１つを送達するために使用され得る。

【０１９１】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に開示されるｇＲＮＡのうちのいずれか１つをエクスビボで細胞に送達する方法を含み、ｇＲＮＡは、ＬＮＰと会合するか、またはＬＮＰと会合しない。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡ／ＬＮＰまたはｇＲＮＡはま

た、Ｃａｓ９またはＣａｓ９をコードするｍＲＮＡと会合する。
【０１９２】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるガイドＲＮＡ組成物は、単独で、または１つ以上のベクターにコードされて、脂質ナノ粒子に製剤化されるか、または脂質ナノ粒子を介して投与される。例えば、各々の内容が参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる、ＷＯ２０１７／１７３０５４及びＷＯ２０２１／２２２２８７を参照のこと。
【０１９３】
特定の実施形態では、本発明は、本明細書に記載されるガイド配列のうちのいずれか１つ以上を含むガイドＲＮＡのいずれかをコードするＤＮＡまたはＲＮＡベクターを含む。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡ配列に加えて、ベクターは、ガイドＲＮＡをコードしない核酸をさらに含む。ガイドＲＮＡをコードしない核酸としては、限定されないが、プロモーター、エンハンサー、制御配列、及びＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼ（Ｃａｓ９などのヌクレアーゼであってもよい）をコードする核酸が挙げられる。いくつかの実施形態では、ベクターは、ｃｒＲＮＡ、ｔｒＲＮＡ、またはｃｒＲＮＡ及びｔｒＲＮＡをコードする１つ以上のヌクレオチド配列（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、ｓｇＲＮＡをコードする１つ以上のヌクレオチド配列と、ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡと、を含み、ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼは、ＣａｓヌクレアーゼＣａｓ９またはＣｐｆ１であってもよい。いくつかの実施形態では、ベクターは、ｃｒＲＮＡ、ｔｒＲＮＡをコードする１つ以上のヌクレオチド配列と、ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡと、を含み、ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼは、Ｃａｓタンパク質、例えば、Ｃａｓ９であってもよい。一実施形態では、Ｃａｓ９は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ由来である（すなわち、Ｓｐｙ　Ｃａｓ９）。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ、ｔｒＲＮＡ、またはｃｒＲＮＡ及びｔｒＲＮＡ（ｓｇＲＮＡであってもよい）をコードするヌクレオチド配列は、天然に存在するＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系由来の反復配列の全てまたは一部が隣接するガイド配列を含むか、またはそれらからなる。ｃｒＲＮＡ、ｔｒＲＮＡ、またはｃｒＲＮＡ及びｔｒＲＮＡを含むか、またはそれらからなる核酸は、さらにベクター配列を含んでいてもよく、ここで、ベクター配列は、自然状態ではｃｒＲＮＡ、ｔｒＲＮＡ、またはｃｒＲＮＡ及びｔｒＲＮＡとともに見出されない核酸配列を含むか、またはそれらからなる。
【０１９４】
いくつかの実施形態では、構成要素は、裸の核酸として、リポソームまたはポロキサマーなどの薬剤と複合体化された核酸として導入され得るか、またはそれらは、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、ＡＡＶ、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス）によって送達され得る。核酸の非ウイルス送達のための方法及び組成物は、エレクトロポレーション、リポフェクション、マイクロインジェクション、生物学的性質、ビロソーム、リポソーム、免疫リポソーム、ＬＮＰ、ポリカチオンまたは脂質：核酸コンジュゲート、裸の核酸（例えば、裸のＤＮＡ／ＲＮＡ）、人工ビリオン、及びＤＮＡの薬剤強化された取り込みを含む。例えば、Ｓｏｎｉｔｒｏｎ　２０００システム（Ｒｉｃｈ－Ｍａｒ）を使用するソノポレーション（Ｓｏｎｏｐｏｒａｔｉｏｎ）を、核酸の送達のために使用することもできる。
【０１９５】
この説明及び例示的な実施形態は、限定として解釈されるべきではない。本明細書及び添付の特許請求の範囲において、別途指示されない限り、本明細書及び特許請求の範囲で使用される量、パーセンテージ、または割合、及び他の数値を表す全ての数字は、どの場合においても「約」という用語によって、まだそれほど修飾されていない程度で修飾されていると理解されるべきである。したがって、そうでないことが示されない限り、以下の明細書及び添付の特許請求の範囲に示される数値パラメータは、得ようとする所望の特性に応じて変化し得る近似値である。非常に少なくとも、及び均等論の適用を特許請求の範囲に限定する試みとしてではなく、各数値パラメータは、報告された有効数字の数を考慮して、通常の丸め手法を適用することにより、少なくとも解釈されるべきである。

【実施例】
【０１９６】
以下の実施例は、特定の開示された実施形態を例示するために提供され、本開示の範囲を決して限定するものとして解釈されるべきではない。
【０１９７】
実施例１－材料及び方法
次世代シークエンシング（「ＮＧＳ」）及びオンターゲット切断効率の分析
ゲノムＤＮＡは、ＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ（商標）ＤＮＡ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｌｕｃｉｇｅｎ、カタログ番号ＱＥ０９０５０）を使用して、製造者のプロトコルに従って抽出した。
【０１９８】
ゲノム中の標的位置における編集効率を定量的に決定するために、ディープシークエンシングを使用して、遺伝子編集によって導入された挿入及び欠失（「インデル」）の存在を同定した。目的の遺伝子（例えば、ＬＡＧ３）内の標的部位周辺でＰＣＲプライマーを設計し、目的のゲノム領域を増幅させた。プライマー配列設計は、現場で標準として行われた。シークエンシングのために必要な化学的性質を付加するために製造者のプロトコル（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）に従って追加のＰＣＲを実施した。アンプリコンをＩｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑ装置でシークエンシングした。低品質スコアを有する読み取りを除去した後に、読み取りをヒト参照ゲノム（例えば、ｈｇ３８）とアラインメントした。読み取り値を含む得られたファイルを、参照ゲノム（ＢＡＭファイル）に対してマッピングし、目的の標的配列と重なり合った読み取り値を選択し、野生型の読み取り値の数と、挿入または欠失（「インデル」）を含む読み取り値の数を計算した。
【０１９９】
実施例において使用される編集パーセンテージ（例えば、「編集効率」または「インデルパーセント」）は、野生型を含む配列読み取りの総数に対する、挿入または欠失（「インデル」）を含む配列読み取りの総数であると定義される。
【０２００】
脂質ナノ粒子の調製。
別途指定されない限り、脂質構成要素を、様々なモル比で、１００％エタノールに溶解した。ＲＮＡカーゴ（例えば、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡ）を、２５ｍＭのクエン酸塩、１００ｍＭのＮａＣｌ（ｐＨ５．０）に溶解して、およそ０．４５ｍｇ／ｍＬのＲＮＡカーゴ濃度を得た。
【０２０１】
別途指定されない限り、脂質核酸アセンブリは、３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエノエート）とも呼ばれる、イオン化可能な脂質Ａ（（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル　オクタデカ－９，１２－ジエノエート、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを、それぞれ５０：３８：９：３のモル比で含んでいた。脂質核酸アセンブリは、別途指定されない限り、約６の脂質アミン対ＲＮＡホスフェートの（Ｎ：Ｐ）モル比、及び１：１のｇＲＮＡ対ｍＲＮＡの重量比で配合した。
【０２０２】
クロスフロー技術を使用し、エタノール中の脂質を２体積のＲＮＡ溶液及び１体積の水と衝突噴流混合することによって、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を調製した。エタノール中の脂質を、交差混合により、２体積部のＲＮＡ溶液と混合する。第４の水の流れを、直列のティー（ｔｅｅ）を通る交差の出口流と混合した（ＷＯ２０１６０１０８４０の図２を参照）。ＬＮＰを室温（ＲＴ）で１時間保持し、さらに水で希釈した（およそ１：１　ｖ／ｖ）。ＬＮＰを、フラットシートカートリッジ（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ、１００ｋＤ　ＭＷ

ＣＯ）でタンジェンシャルフロー濾過を使用して濃縮し、ＰＤ－１０脱塩カラム（ＧＥ）を用い、緩衝液を５０ｍＭのＴｒｉｓ、４５ｍＭのＮａＣｌ、５％（ｗ／ｖ）のスクロース、ｐＨ７．５（ＴＳＳ）に交換した。あるいは、ＬＮＰを、任意選択で、１００ｋＤａのアミコンスピンフィルターを使用して濃縮し、ＰＤ－１０脱塩カラム（ＧＥ）を使用して緩衝液をＴＳＳに交換した。次いで、得られた混合物を０．２μｍの滅菌フィルターを使用して濾過した。最終ＬＮＰを、さらなる使用まで４℃または－８０℃で保存した。

【０２０３】

ｍＲＮＡのインビトロ転写（「ＩＶＴ」）

Ｎ１－メチルシュード－Ｕを含むキャップされたポリアデニル化ｍＲＮＡを、線状プラスミドＤＮＡテンプレート及びＴ７　ＲＮＡポリメラーゼを使用したインビトロ転写によって生成した。Ｔ７プロモーター、転写のための配列、及びポリアデニル化配列を含有するプラスミドＤＮＡを、以下の条件下、ＸｂａＩと３７°Ｃで２時間インキュベートすることによって線状化した。２００ｎｇ／μＬのプラスミド、２Ｕ／μＬのＸｂａＩ（ＮＥＢ）、及び１ｘ反応緩衝液の条件で、ＸｂａＩとともに３７℃で２時間インキュベートすることによって線状化する。ＸｂａＩを、反応物を６５°Ｃで２０分間加熱することによって不活性化した。線状プラスミドを、酵素及び緩衝塩から精製した。修飾ｍＲＮＡを生成するためのＩＶＴ反応を、以下の条件下、３７°Ｃで１．５～４時間インキュベートすることによって行った。５０ｎｇ／μＬの線状プラスミド、ＧＴＰ、ＡＴＰ、ＣＴＰ、及びＮ１－メチルシュードＵＴＰ（Ｔｒｉｌｉｎｋ）の各々、２～５ｍＭ、１０～２５ｍＭのＡＲＣＡ（Ｔｒｉｌｉｎｋ）、５Ｕ／μＬのＴ７　ＲＮＡポリメラーゼ（ＮＥＢ）、１Ｕ／μＬのマウスＲＮａｓｅ阻害剤（ＮＥＢ）、０．００４Ｕ／μＬの無機Ｅ．ｃｏｌｉピロホスファターゼ（ＮＥＢ）、ならびに１ｘ反応緩衝液。ＴＵＲＢＯ　ＤＮａｓｅ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を、最終濃度が０．０１Ｕ／μＬになるように添加し、反応物をさらに３０分間インキュベートして、ＤＮＡテンプレートを除去した。ＭｅｇａＣｌｅａｒ転写クリーンアップキット（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）またはＲＮｅａｓｙ　Ｍａｘｉキット（Ｑｉａｇｅｎ）を製造者のプロトコルに従って使用し、ｍＲＮＡを精製した。あるいは、ｍＲＮＡを沈殿プロトコルにより精製し、いくつかの場合では、これに続いてＨＰＬＣベースの精製を行った。簡潔に述べると、ＤＮａｓｅ消化後、ＬｉＣｌ沈殿、酢酸アンモニウム沈殿、及び酢酸ナトリウム沈殿を使用して、ｍＲＮＡを精製する。ＨＰＬＣ精製ｍＲＮＡについて、ＬｉＣｌ沈殿及び再構成後、ｍＲＮＡをＲＰ－ＩＰ　ＨＰＬＣによって精製した（例えば、Ｋａｒｉｋｏ，ｅｔ　ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２０１１，Ｖｏｌ．　３９，Ｎｏ．２１　ｅ１４２を参照のこと）。プールのために選択された画分を合わせ、上記の酢酸ナトリウム／エタノール沈殿によって脱塩した。さらなる代替方法において、ＬｉＣｌ沈殿法、続いてタンジェンシャルフロー濾過によるさらなる精製によって、ｍＲＮＡを精製した。ＲＮＡ濃度を、２６０ｎｍ（Ｎａｎｏｄｒｏｐ）での光吸光度を測定することによって決定し、転写産物をＢｉｏａｎｌａｙｚｅｒ（Ａｇｉｌｅｎｔ）によるキャピラリー電気泳動によって分析した。

【０２０４】

配列番号８０１～８０３に従って、オープンリーディングフレームをコードするプラスミドＤＮＡからＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ（「Ｓｐｙ」）Ｃａｓ９ｍＲＮＡを生成した（表１１の配列を参照）。配列番号８０１～８０３がＲＮＡに関して以下で言及される場合、Ｔは、Ｕ（上記のようなＮ１－メチルシュードウリジンであった）で置き換えられるべきであることが理解される。実施例で使用されるメッセンジャーＲＮＡは、５’キャップ及び３’ポリＡテール、例えば、最大１００ｎｔを含み、表１１の配列番号８０１～８０３によって同定される。

【０２０５】

実施例２－ＨＥＫ細胞におけるＬＡＧ３ガイドの設計及びスクリーニング

【表５－１】

表３Ａ：ヒトＬＡＧ３ガイド配列

ガイド番号	配列番号	ガイド配列	ゲノム座標(hg38)
CR007086	18	GUGCAUUGGUUCCGGAACCG	chr12:6774680-6774700
CR007087	12	GCUUUCCGCUAAGUGGUGAU	chr12:6774735-6774755
CR007088	19	UCGACUAGAGGAUGUGAGCC	chr12:6775444-6775464
CR007089	17	GGCUCACAUCCUCUAGUCGA	chr12:6775444-6775464
CR007090	20	AGCGCGGGGACUUCUCGCUA	chr12:6773872-6773892
CR007091	21	CGCCCCACAUACUCGAGGCC	chr12:6773993-6774013
CR007092	22	GCGUACACUGUCAAGGGAGU	chr12:6775286-6775306
CR007093	14	GCUCCAGCGUACACUGUCAA	chr12:6775292-6775312
CR007094	23	CGACUUUACCCUUCGACUAG	chr12:6775432-6775452
CR007095	24	UCCAUAGGUGCCCAACGCUC	chr12:6777783-6777803
CR007096	25	CACCGCGGCGCGGUACUCGC	chr12:6773923-6773943
CR007097	26	CCAUAGGUGCCCAACGCUCU	chr12:6777784-6777804
CR007098	27	UUGGUUCCGGAACCGGGGCC	chr12:6774685-6774705
CR007099	28	ACCGUGUAGCGGCGGGGCCU	chr12:6773772-6773792
CR007100	29	CGCUACACGGUGCUGAGCGU	chr12:6773781-6773801
CR007101	30	CGCGUCCAGCUGGAUGAGCG	chr12:6773844-6773864
CR007102	11	CCCGCCAUCCCCGUUUUACC	chr12:6772909-6772929
CR007103	31	UGACCCCUGCUCUUCGCAGA	chr12:6773297-6773317
CR007104	8	UUCCGCUAAGUGGUGAUGGG	chr12:6774732-6774752
CR007105	32	UCCAGCUGGAUGAGCGCGGC	chr12:6773848-6773868
CR007106	1	GCGGUCCCUGAGGUGCACCG	chr12:6773938-6773958
CR007107	33	GAUGGGGGGACUCCCGGACA	chr12:6774718-6774738
CR007108	34	GCCGGCCGCGCUCAUCCAGC	chr12:6773852-6773872
CR007109	35	GCAAGGGAUUCACCCUCCGC	chr12:6778272-6778292
CR007110	36	GUACGCUGGAGCAGGUUCCA	chr12:6775300-6775320
CR007111	37	ACUCGCCGGCGUCCGCGCGC	chr12:6773909-6773929
CR007112	38	CGCUCAGCACCGUGUAGCGG	chr12:6773780-6773800

【表５－２】

ガイド番号	配列番号	ガイド配列	ゲノム座標(hg38)
CR007113	39	AUGAGCGCGGCCGGCAGCGC	chr12:6773857-6773877
CR007114	40	GCUCACAUCCUCUAGUCGAA	chr12:6775443-6775463
CR007115	41	UCUAAGGCAGAAAAUCGUCU	chr12:6778252-6778272
CR007116	42	UGCUCCAGCGUACACUGUCA	chr12:6775293-6775313
CR007117	4	GACGUUGAAGCCAUCUCUGU	chr12:6774816-6774836
CR007118	43	CACCGUGUAGCGGCGGGGCC	chr12:6773773-6773793
CR007119	44	ACCGCGCCGCGGUGCACCUC	chr12:6773929-6773949
CR007120	45	AGCUUUCCGCUAAGUGGUGA	chr12:6774736-6774756
CR007121	46	CUGUGCAUUGGUUCCGGAAC	chr12:6774678-6774698
CR007122	47	UGGGGCUCUCCCAGAGCGUU	chr12:6777796-6777816
CR007123	5	AGAGGAAGCUUUCCGCUAAG	chr12:6774742-6774762
CR007124	15	UGGCAAUGCCAGCUGUACCA	chr12:6777433-6777453
CR007125	48	CUCAGCACCGUGUAGCGGCG	chr12:6773778-6773798
CR007126	49	GCUCAGCACCGUGUAGCGGC	chr12:6773779-6773799
CR007127	50	CGCCGGCGAGUACCGCGCCG	chr12:6773918-6773938
CR007128	51	UGUACGCUGGAGCAGGUUCC	chr12:6775299-6775319
CR007129	52	UUGGCAAUGCCAGCUGUACC	chr12:6777432-6777452
CR007130	53	UGAUGGGGGGACUCCCGGAC	chr12:6774719-6774739
CR007131	2	GUUCCGGAACCAAUGCACAG	chr12:6774678-6774698
CR007132	54	UUGACAGUGUACGCUGGAGC	chr12:6775292-6775312
CR007133	55	CGCGCUCAUCCAGCUGGACG	chr12:6773846-6773866
CR007134	13	CCACGCUCAGCACCGUGUAG	chr12:6773783-6773803
CR007135	56	CGUCCCGCCCCACAUACUCG	chr12:6773998-6774018
CR007136	57	CGUACACUGUCAAGGGAGUU	chr12:6775285-6775305
CR007137	58	GCGAGAAGUCCCCGCGCUGC	chr12:6773870-6773890
CR007138	59	AAGCGUUCUUGUCCAGAUAC	chr12:6777325-6777345
CR007139	60	CUCGCCGGCGUCCGCGCGCC	chr12:6773908-6773928
CR007140	16	AGGGUGAAUCCCUUGCUCUA	chr12:6778268-6778288
CR007141	61	UGGGCGGUCAGGGCGGCUGA	chr12:6774654-6774674
CR007142	62	UGUGCAUUGGUUCCGGAACC	chr12:6774679-6774699
CR007143	63	CCGCUACACGGUGCUGAGCG	chr12:6773780-6773800
CR007144	64	CCGCGCCGCGGUGCACCUCA	chr12:6773930-6773950
CR007145	65	GCGCUCAUCCAGCUGGACGC	chr12:6773845-6773865
CR007146	66	GAUGAGCGCGGCCGGCAGCG	chr12:6773856-6773876
CR007147	67	GUUCAAAAUGACCCAGUCGG	chr12:6774627-6774647
CR007148	7	GUCCCCCCAUCACCACUUAG	chr12:6774727-6774747

【表５－３】

ガイド番号	配列番号	ガイド配列	ゲノム座標(hg38)
CR007149	68	CCCUGAGGUGCACCGCGGCG	chr12:6773933-6773953
CR007150	69	ACUCCCUUGACAGUGUACGC	chr12:6775286-6775306
CR007151	70	CCAGCCCGGCGCGCGGACGC	chr12:6773901-6773921
CR007152	71	ACGCUUUGUGUGGAGCUCUC	chr12:6777339-6777359
CR007153	72	UGUGAGGUGACUCCAGUAUC	chr12:6777310-6777330
CR007154	10	AGAGUCCAUGGGGCUGACUU	chr12:6774771-6774791
CR007155	73	ACGGUGCUGAGCGUGGGUCC	chr12:6773787-6773807
CR007156	74	GUCCCGGAGGCCUGCGCAGC	chr12:6773803-6773823
CR007157	75	CAGCCUCUGUGCAUUGGUUC	chr12:6774672-6774692
CR007158	76	AACAGUGAGGUUAUACAUGA	chr12:6774840-6774860
CR007159	77	CAAGUCAGCCCCAUGGACUC	chr12:6774770-6774790
CR007160	3	UUACCUGGAGCCACCCAAAG	chr12:6772894-6772914
CR007161	78	AUCUCUCAGAGCCUCCGACU	chr12:6774613-6774633
CR007162	79	CUCCCGCUGCGCAGGCCUCC	chr12:6773808-6773828
CR007163	80	GGGGCAGCCUCCCGCUGCGC	chr12:6773816-6773836
CR007164	9	GCAAUGCCAGCUGUACCAGG	chr12:6777435-6777455
CR007165	81	GCUCAAUGCCACUGUCACAU	chr12:6775513-6775533
CR007166	82	CUUUCCGCUAAGUGGUGAUG	chr12:6774734-6774754
CR007167	83	CUGGACAAGAACGCUUUGUG	chr12:6777329-6777349
CR007168	6	UCCCCCAGGAGGAGUCCACU	chr12:6775380-6775400
CR007169	84	CUUUGGGUCACCUGGAUCCC	chr12:6777276-6777296
CR007170	85	ACAUACUCGAGGCCUGGCCC	chr12:6773987-6774007
CR007171	86	CCCGGACAGGGACUCGGCCC	chr12:6774706-6774726
CR007172	87	GGGACUCCCGGACAGGGACU	chr12:6774712-6774732
CR007173	88	CGCCAUUGUCUCCAGUCACC	chr12:6775414-6775434

【０２０６】

各々のｃｒＲＮＡについて、示された２０ｎｔガイド配列は、Ｎ２０ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＵＧＣＵＧＵＵＵＵＧ（配列番号：９９）核酸配列内に含まれており、ここで、「Ｎ２０」はガイド配列を表す。

【０２０７】

目的の領域においてＰＡＭを同定するために、ヒト参照ゲノム（例えば、ｈｇ３８）及び目的のユーザが規定したゲノム領域（例えば、ＬＡＧ３）を用い、初期のガイド選択をインシリコで行った。同定された各ＰＡＭについて、分析を行い、統計を報告した。ｇＲＮＡ分子をさらに選択し、当該技術分野において既知のいくつかの基準（例えば、ＧＣ含有量、予測されるオンターゲット活性、及び潜在的オフターゲット活性）に基づいてランク付けした。

【０２０８】

合計８８個のガイドＲＮＡを、ＬＡＧ３（ＥＮＳＧ００００００８９６９２）に対して試験した。ガイド配列及び対応するゲノム座標を上に提供する（表１）。

【０２０９】

ガイドを、当初は、ＨＥＫ２９３＿Ｃａｓ９細胞における編集効率についてスクリーニングした。Ｓｐｙ　Ｃａｓ９を構成的に発現するヒト胚性腎臓腺癌細胞株ＨＥＫ２９３（「ＨＥＫ２９３＿Ｃａｓ９」）を、１０％のウシ胎仔血清を補充したＤＭＥＭ培地中で培養した。トランスフェクションの約２４時間前に、細胞を９６ウェルプレート中で１０，０００細胞／ウェルの密度でプレーティングした（トランスフェクション時に約７０％のコンフルエント）。細胞を、リポフェクタミンＲＮＡｉＭＡＸ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ，カタログ１３７７８１５０）によって、製造者のプロトコルに従ってトランスフェクトした。細胞を、個々のガイド（２５ｎＭ）、ｔｒＲＮＡ（２５ｎＭ）、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ＲＮＡｉＭＡＸ（０．３μＬ／ウェル）、及びＯｐｔｉＭｅｍ培地を含むリポプレックスによってトランスフェクトした。ＤＮＡ単離及びＮＧＳ分析を、実施例１に記載されるように行った。表３Ｂは、ＨＥＫ２９３＿ＣＡＳ９細胞おける、これらガイドによる、ＬＡＧ３遺伝子座でのインデル％を示している。「データ無し」は、プライマーセットが算出された編集パーセンテージを生成できなかったことを示す。

【表６】

表３Ｂ－ＨＥＫ２９３細胞におけるＬＡＧ３遺伝子座における平均パーセント編集。

ガイド番号	平均値	SD	ガイド番号	平均値	SD	ガイド番号	平均値	SD
CR007086	31.60	4.46	CR007115	65.10	5.11	CR007145	4.73	0.33
CR007087	68.47	1.72	CR007116	16.37	0.98	CR007146	9.20	1.93
CR007088	2.23	0.26	CR007117	60.97	2.48	CR007147	11.93	1.44
CR007089	40.70	4.65	CR007118	0.17	0.05	CR007148	45.27	5.44
CR007090	17.43	2.81	CR007119	1.20	0.22	CR007149	19.57	3.04
CR007091	0.50	0.08	CR007120	19.03	1.80	CR007150	4.17	0.83
CR007092	24.70	10.53	CR007121	データ無し		CR007151	5.27	0.42
CR007093	61.47	3.44	CR007122	23.23	4.37	CR007152	45.20	3.86
CR007094	2.63	0.33	CR007123	44.80	3.35	CR007153	8.77	2.15
CR007095	40.30	1.27	CR007124	78.90	2.90	CR007154	61.23	5.60
CR007096	30.63	4.19	CR007125	9.57	2.15	CR007155	17.80	3.12
CR007097	50.17	2.81	CR007126	6.07	1.17	CR007156	3.83	0.39
CR007098	0.17	0.05	CR007127	1.23	0.12	CR007157	21.60	0.73
CR007099	0.23	0.12	CR007128	3.70	1.16	CR007158	33.67	9.77
CR007100	21.93	2.62	CR007129	45.30	1.76	CR007159	5.20	0.43
CR007101	7.87	1.84	CR007130	2.30	0.29	CR007160	78.97	3.24
CR007102	60.87	7.04	CR007131	68.03	3.29	CR007161	25.07	3.41
CR007103	27.60	7.59	CR007132	2.57	1.03	CR007162	48.60	7.08
CR007104	73.63	5.00	CR007133	5.17	2.07	CR007163	0.30	0.08
CR007105	47.33	13.32	CR007134	34.70	6.35	CR007164	75.03	2.08
CR007106	64.97	11.23	CR007135	6.93	2.16	CR007165	49.33	4.42
CR007107	3.57	0.21	CR007136	8.37	0.76	CR007166	23.03	4.57
CR007108	3.67	0.68	CR007137	8.53	1.47	CR007167	75.10	3.74
CR007109	34.23	2.28	CR007138	43.73	13.66	CR007168	73.63	2.67
CR007110	14.40	2.33	CR007139	0.93	0.21	CR007169	10.30	1.08
CR007111	7.57	2.56	CR007140	68.83	4.39	CR007170	3.07	0.58
CR007112	11.43	0.60	CR007141	53.33	4.81	CR007171	2.77	0.58
CR007113	1.50	0.41	CR007142	9.07	0.98	CR007172	15.40	2.47
CR007114	27.13	5.92	CR007143	5.13	0.82	CR007173	23.47	4.01
			CR007144	15.23	2.04			

【０２１０】

実施例３－ヒトＣＤ３＋Ｔ細胞におけるＬＡＧ３ガイドスクリーニング

実施例２のＨＥＫ２９３＿Ｃａｓ９細胞の編集スクリーニングからのガイドを、ヒトＣＤ３$^+$Ｔ細胞における編集効率についてスクリーニングした。ＣＤ３$^+$Ｔ細胞は、ＣＤ４$^+$Ｔヘルパー細胞及びＣＤ８$^+$細胞傷害性Ｔ細胞を含む複数のＴ細胞集団からなる。これらの細胞は、全血または白血球泳動試料から単離することができる。Ｔ細胞は、Ｃａｓ９媒介編集を使用してＴ細胞を操作することによって、がん細胞を特異的に標的とし、免疫原性が低くなるように修飾することができる。

【０２１１】

実施例３．１．Ｔ細胞へのＲＮＰの送達

Ｔ細胞は、市販されているか（例えば、ヒト末梢血ＣＤ４＋ＣＤ４５ＲＡ＋Ｔ細胞、Ｆｒｏｚｅｎ、Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ７００２９）、またはロイコパックから内部的に調製された。内部調製のために、市販のキット（例えば、ＥａｓｙＳｅｐ（商標）ヒトＴ細胞単離キット、Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）を使用して、Ｔ細胞を最初にロイコパックから濃縮した。濃縮したＴ細胞を等分し、将来の使用のために（５×１０^{6}／バイアルで）凍結させた。その後、バイアルを必要に応じて解凍し、Ｔ細胞培地（ＲＰＭＩ １６４０、ＦＢＳ、Ｌ－グルタミン、非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、ＨＥＰＥＳ緩衝液、２－メルカプトエタノール、及び任意選択でＩＬ２）中の３：１の比のＣＤ３／ＣＤ２８ビーズ（Ｄｙｎａｂｅａｄｓ、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を添加することによって活性化した。個々のｃｒＲＮＡ及びｔｒＲＮＡを、等量の試薬を混合し、９５℃で２分間インキュベートし、室温まで冷却することによって予めアニーリングすることによって、ＲＮＰを生成した。予めアニーリングしたｃｒＲＮＡ及びｔｒＲＮＡからなるデュアルガイド（ｄｇＲＮＡ）を、ＳｐｙＣａｓ９タンパク質とともにインキュベートし、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を形成した。ＣＤ３＋Ｔ細胞を、Ｐ３ Ｐｒｉｍａｒｙ Ｃｅｌｌ ９６－ｗｅｌｌ Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（商標）キット（Ｌｏｎｚａ、カタログＶ４ＳＰ－３９６０）を使用し、刺激されたヒトＴ細胞のための製造者のＡｍａｘａ（商標）９６－ｗｅｌｌ Ｓｈｕｔｔｌｅ（商標）プロトコルを使用して、Ｓｐｙ Ｃａｓ９（１０ｎＭ）、個々のガイド（１０ｎＭ）及びトレーサーＲＮＡ（１０ｎＭ）を含有するＲＮＰで三重にトランスフェクトした。Ｔ細胞培地を、ヌクレオフェクション直後の細胞に添加し、２日間以上培養した。

【０２１２】

ヌクレオフェクションの２日後に、ゲノムＤＮＡを、実施例１に記載されるように調製し、ＮＧＳ分析を行った。表４Ａ及び図１は、ＣＤ３＋Ｔ細胞におけるＮＧＳ編集％のデータを示す。

【表７】

表４Ａ：初代Ｔ細胞におけるＬＡＧ３遺伝子座での平均パーセント編集。

	ドナー０１８		ドナー１００		ドナー３１５		ドナー７９７	
ガイド番号	平均値	ＳＤ	平均値	ＳＤ	平均値	ＳＤ	平均値	ＳＤ
CR007106	47.23	1.21	52.63	4.74	68.47	2.12	62.63	2.61
CR007131	63.43	3.81	62.83	3.78	76.47	1.87	63.20	2.31
CR007160	32.73	4.95	43.13	12.38	53.33	1.16	37.93	4.57
CR007117	42.30	3.91	45.17	8.43	50.27	3.07	45.63	1.66
CR007123	29.97	1.82	31.87	3.16	44.97	1.86	34.87	1.90
CR007168	34.37	3.04	29.30	2.84	50.80	3.05	35.93	2.68
CR007148	31.30	2.88	36.50	6.05	44.53	0.50	35.10	3.15
CR007104	28.20	2.69	29.73	1.65	32.67	2.40	31.40	1.59
CR007164	44.90	2.13	53.77	6.24	57.77	2.12	44.90	0.70
CR007154	28.57	3.25	27.70	4.17	36.13	0.81	31.00	0.76
CR007102	21.20	3.44	29.03	3.49	35.23	2.20	24.10	1.93
CR007087	26.20	2.60	26.33	3.04	29.93	2.54	28.87	2.60
CR007134	データ無し		データ無し		37.77	3.71	25.40	1.59
CR007093	25.40	1.22	27.20	2.10	35.13	1.38	28.43	0.81
CR007124	31.63	3.59	36.37	5.73	49.37	1.45	42.90	3.57
CR007140	28.57	1.70	29.97	3.81	36.43	3.07	30.47	0.32
CR007089	13.60	1.31	13.13	4.74	32.03	0.50	20.53	2.37
CR007097	14.73	2.72	21.00	2.35	27.33	1.16	22.43	1.27
CR007167	11.33	0.38	10.50	0.87	14.93	1.10	12.23	1.37
CR007138	データ無し		データ無し		データ無し		データ無し	
CR007115	7.10	0.96	8.10	1.97	11.30	0.82	7.40	0.61
CR007095	6.47	0.57	6.80	0.80	13.03	0.70	10.53	0.40
CR003187-VEGFA	15.60	4.90	17.80	14.71	16.33	1.78	13.40	1.15

【０２１３】

エレクトロポレーションの７日後、１：１の比のＣＤ３／ＣＤ２８ビーズ（Ｄｙｎａｂｅａｄｓ、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）対細胞を使用して、細胞を再刺激した。エレクトロポレーション後１１日目に、Ｔ細胞をフローサイトメトリーによってアッセイして、ＬＡＧ３表面タンパク質発現を評価した。Ｔ細胞を、ＬＡＧ３（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３６９３１４）を認識する抗体とインキュベートし、固定可能な生死染料（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、カタログＬ３４９７５）で染色した。その後、細胞をＣｙｔｏｆｌｅｘ　ＬＸ装置（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）で処理し、データを、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアパッケージを使用して分析した。ＬＡＧ３細胞表面タンパク質を発現する細胞のパーセンテージを表４Ｂ及び図２Ａ～Ｂに示す。

【表８】

表４Ｂ－デュアルガイド編集後のＬＡＧ３陽性ヒトＣＤ３＋　Ｔ細胞の割合

	ドナー０１８		ドナー１００		ドナー３１５		ドナー７９７	
crRNA	平均% LAG3+	ＳＤ	平均% LAG3+	ＳＤ	平均% LAG3+	ＳＤ	平均% LAG3+	ＳＤ
CR007106	5.6	0.3	7.4	1.1	6.0	0.5	5.5	0.2
CR007131	8.2	0.5	6.9	0.4	7.6	0.7	5.1	0.6
CR007160	35.8	2.1	34.0	1.0	20.9	0.9	22.4	0.5
CR007117	38.1	2.4	31.2	0.7	33.3	3.1	23.8	1.8
CR007123	54.6	1.0	52.6	2.5	43.4	1.2	31.2	2.3
CR007168	55.2	0.4	54.6	2.0	35.4	1.7	34.5	3.0
CR007148	56.6	1.8	56.7	3.0	43.7	0.6	33.5	1.2
CR007104	58.5	1.7	62.1	3.1	61.0	1.7	44.8	1.3
CR007164	63.8	1.8	56.5	5.6	43.0	2.7	41.0	1.7
CR007154	64.8	0.3	69.0	2.1	59.2	2.0	49.5	0.8
CR007102	65.3	1.7	71.8	3.1	54.7	2.5	52.1	2.6
CR007087	66.7	1.1	64.9	4.8	64.2	3.0	48.1	2.0
CR007134	69.8	2.2	68.3	3.4	41.6	3.4	41.2	0.8
CR007093	70.0	1.2	67.9	1.6	53.7	1.9	46.0	0.9
CR007124	74.2	1.6	71.0	0.6	52.8	2.9	46.8	1.2
CR007140	77.9	0.4	74.9	1.5	63.2	2.3	57.2	0.7
CR007089	80.4	2.7	78.8	0.4	55.3	4.1	56.8	5.5
CR007097	83.8	2.2	82.5	2.5	76.4	0.9	69.2	0.8
CR007167	86.9	1.7	88.6	0.6	76.7	4.6	70.0	1.0
CR007138	87.9	1.4	89.5	1.6	80.5	2.1	74.8	1.7
CR007115	88.0	0.6	90.4	1.1	77.5	4.6	73.5	2.2
CR007095	88.7	1.0	87.1	3.2	78.2	2.0	67.5	1.4
CR003187-VEGFA	88.7	1.0	85.6	6.0	81.3	0.9	74.1	0.7
CR003187	88.1	1.4	90.1	2.4	81.3	0.9	74.1	0.7

【０２１４】

実施例４－ＬＡＧ３ガイドのオフターゲット分析

生化学的方法（例えば、Ｃａｍｅｒｏｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｔｈｏｄｓ．６，６００－６０６；２０１７）を使用して、ＬＡＧ３を標的とするガイドを使用して、Ｃａｓ９によって切断される潜在的なオフターゲットゲノム部位を決定した。実施例３での大抵のＬＡＧ３陰性細胞を、このアッセイで潜在的なオフターゲットゲノム切断部位について試験した。この実験では、ヒトＬＡＧ３を標的とする１５個のｄｇＲＮＡを、陽性の対照ガイドである、公知のオフターゲットプロファイルを有するＧ０００６４５と一緒にプールした男性ヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）由来の精製ヒトゲノムＤＮＡを用いて三重にスクリーニングしました。生化学アッセイにおいて６４ｎＭのガイド濃度を使用して検出された潜在的なオフターゲット部位の数を表４Ｃに示す。

【表９】

表４Ｃ－生化学的アッセイで予測したＬＡＧ３ガイドの潜在的なオフターゲット部位

ガイド	標的	総部位数
CR007087	LAG3	43
CR007093	LAG3	45
CR007102	LAG3	100
CR007104	LAG3	126
CR007106	LAG3	272
CR007117	LAG3	224
CR007123	LAG3	51
CR007124	LAG3	223
CR007131	LAG3	93
CR007134	LAG3	78
CR007148	LAG3	233
CR007154	LAG3	504
CR007160	LAG3	442
CR007164	LAG3	232
CR007168	LAG3	770
G000645	VEGFA	6071

【０２１５】

実施例４．１．潜在的なオフターゲット部位を検証するための標的シークエンシング

上で使用される生化学的方法などの既知のオフターゲット検出アッセイでは、多数の潜在的なオフターゲット部位が、典型的には、設計によって回収され、他の状況、例えば目的の一次細胞において検証することができる潜在的な部位に対して「ワイドネットをキャストする」ようにする。例えば、この生化学的方法は、典型的には、このアッセイが細胞環境を含まない精製された高分子量ゲノムＤＮＡを利用し、使用されるＣａｓ９　ＲＮＰの用量に依存するため、潜在的なオフターゲット部位の数を過剰に表す。したがって、これらの方法によって特定された潜在的なオフターゲット部位は、特定された潜在的なオフターゲット部位の標的シークエンシングを使用して検証され得る。

【０２１６】

１つのアプローチでは、一次Ｔ細胞を、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及び目的のｓｇＲＮＡ（例えば、評価のための潜在的なオフターゲット部位を有するｓｇＲＮＡ）を含むＬＮＰで処理する。次いで、一次Ｔ細胞を溶解し、潜在的なオフターゲット部位（複数可）に隣接するプライマーを使用してＮＧＳ分析のためのアンプリコンを生成する。特定のレベルでのインデルの同定は、潜在的なオフターゲット部位を検証することができるが、潜在的なオフターゲット部位で見出されるインデルの欠如は、利用されたオフターゲットアッセイにおいて偽陽性を示す場合がある。

【０２１７】

実施例５－ＣＤ３＋Ｔ細胞における単一ガイド分析

実施例５．１．－Ｔ細胞へのＲＮＰの送達

Ｔ細胞を、実施例３に概説されるように調製した。単一ガイド（ｓｇＲＮＡ）を９５℃で２分間インキュベートし、室温まで冷却した。次いで、ｓｇＲＮＡをＳｐｙ　Ｃａｓ９タンパク質とインキュベートして、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を形成した。ＣＤ

３＋Ｔ細胞を、Ｐ３　Ｐｒｉｍａｒｙ　Ｃｅｌｌ　９６－ｗｅｌｌ　Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（商標）キット（Ｌｏｎｚａ、カタログＶ４ＳＰ－３９６０）を使用し、刺激されたヒトＴ細胞のための製造者のＡｍａｘａ（商標）９６－ｗｅｌｌ　Ｓｈｕｔｔｌｅ（商標）プロトコルを使用してヌクレオフェクトされた、Ｓｐｙ　Ｃａｓ９（１０ｎＭ）及び個々のｓｇＲＮＡ（１０ｎＭ）を含有するＲＮＰでトランスフェクトした。Ｔ細胞培地を、ヌクレオフェクション直後の細胞に添加し、及び、回収前に１０日間培養を行い、及び実施例１と同様にＮＧＳを行った。

【０２１８】

エレクトロポレーション後７日目に、ＩＬ－２及びＣＤ３／ＣＤ２８ビーズ（Ｄｙｎａｂｅａｄｓ）で培地を調製した。再刺激のための細胞対ビーズ比は、１：１であった。再刺激されたタンパク質レベルを、実施例１と同様に、かつ図３Ａ及び表５に示されるようにＮＧＳで測定した。再刺激されたタンパク質レベルを、実施例３．１と同様にフローサイトメトリーで測定し、図３Ｂ及び表６に示す。

【表１０】

表５：ｓｇＲＮＡ編集後の初代Ｔ細胞におけるＬＡＧ３遺伝子座での平均パーセント編集

ガイド	ドナー1162		ドナー907	
	平均%編集	ＳＤ	平均%編集	ＳＤ
G015069	88.37	1.40	87.77	3.07
G015068	53.80	3.10	66.83	2.85
G015070	57.43	1.90	71.90	6.82
G015071	37.17	0.84	50.90	5.28
VEGFA (対照) G000294	81.70	1.42	66.85	6.45

【表１１】

表６：ｓｇＲＮＡ編集後のＬＡＧ３陽性ヒトＣＤ３＋　Ｔ細胞の平均パーセンテージ（ｎ＝３）

ガイド	ドナー1162		ドナー907	
	平均値	SEM	平均値	SEM
G015069	3.86	0.36	2.43	0.16
G015068	26.40	2.97	14.17	2.47
G15070	32.23	2.51	34.33	3.18
G015071	43.23	3.86	37.93	1.92
VEGFA (対照) G000294	60.77	3.90	77.53	3.00

【０２１９】

実施例６－様々な用量のＲＮＡによるＬＡＧ３編集

Ｔ細胞を、Ｃａｓ９をコードするｍＲＮＡと、ＬＡＧ３または対照遺伝子座を標的とするｓｇＲＮＡとを共製剤化する脂質ナノ粒子の増加量で編集した。凍結保存したＴ細胞を、水浴中で解凍した。Ｔ細胞を、サイトカイン培地１０ｍＬ当たり１５×１０^{6}の密度で再懸濁した。ＴｒａｎｓＡｃｔ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）を１：１００希釈で各フラスコに添加し、３７℃で一晩インキュベートした。

【０２２０】

実施例６．１．ＬＮＰインキュベーション

Ｔ細胞を採取し、サイトカイン（ＩＬ－２（２００Ｕ／ｍＬ）、ＩＬ－７（５ｎｇ／ｍＬ）、及びＩＬ－１５（５ｎｇ／ｍＬ））で調製した培地（血清を含まないＸ－ＶＩＶＯ（商標）基礎培地）中に再懸濁した。ＡｐｏＥ３を、Ｘ－ＶＩＶＯ（商標）５％ ＨＳ培地中の最終濃度が１ｕｇ／ｍＬになるように添加した。表７に示されるガイドで製剤化したＬＮＰを、ＡｐｏＥ培地中で２倍の最終濃度まで調製し、３７℃で１５分間インキュベートした。５０μＬのＬＮＰ－ＡｐｏＥ及び５０μＬのＴ細胞を混合し、２４時間培養した。ＮＧＳ分析を、実施例１と同様に実施した。ＮＧＳデータを表７及び図４に示す。

【表１２】

表７：様々な用量のＬＮＰによるＴ細胞編集のインデルパーセント

用量 (μg /ml)	G018433		G018434		G018438 (対照)		G000739 (対照)	
	平均値	ＳＤ	平均値	ＳＤ	平均値	ＳＤ	平均値	ＳＤ
10	97.03	0.40	98.33	0.15	94.63	1.36	0.17	0.06
5	94.73	0.64	98.13	0.15	91.80	1.11	0.10	0.00
2.5	87.27	0.97	95.93	0.59	76.30	3.38	0.17	0.06
1.25	61.70	4.92	84.57	3.00	28.47	3.58	0.13	0.06
0.625	31.57	5.15	62.67	6.12	6.53	1.23	0.10	0.00
0.3125	12.10	1.92	33.10	8.12	1.70	0.10	0.10	0.00
0.15	3.87	0.72	14.77	3.61	0.87	0.29	0.10	0.00
0.07	1.53	0.32	6.17	0.21	0.47	0.21	0.17	0.06

【０２２１】

実施例７－阻害遺伝子ノックアウトを有する操作されたＴ細胞

Ｔ細胞を、一連の遺伝子破壊及び挿入で操作した。健康なドナー細胞を、３つのＬＮＰで連続的に処理し、各ＬＮＰは、Ｃａｓ９及びｓｇＲＮＡ標的化をコードするｍＲＮＡと共製剤化した。最初に、ＴＲＢＣをノックアウトするように細胞を編集した。ウィルムス腫瘍抗原（ＷＴ１ ＴＣＲ）を標的とするトランスジェニックＴ細胞受容体（配列番号１００１）を、ＡＡＶを使用して相同性指向修復テンプレートを送達することによって、ＴＲＡＣ切断部位に組み込んだ。最後に、ＬＡＧ３をノックアウトするようにＴ細胞を編集した。

【０２２２】

７．１．Ｔ細胞調製

健康なヒトドナーアフェレーシスを商業的に取得し（ＨｅｍａＣａｒｅ）、洗浄し、ＣｌｉｎｉＭＡＣＳ ＰＢＳ／ＥＤＴＡ緩衝液（Ｍｉｌｔｅｎｙｉカタログ１３０－０７０－５２５）に再懸濁した。３人のドナーからのＴ細胞を、ＣＤ４及びＣＤ８磁気ビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ ＢｉｏＴｅｃ、カタログ１３０－０３０－４０１、１３０－０３０－８０１）を使用し、ＣｌｉｎｉＭＡＣＳ Ｐｌｕｓ及びＣｌｉｎｉＭＡＣＳ ＬＳ使い捨てキットを使用して陽性選択によって単離した。Ｔ細胞をバイアルに等分し、Ｃｒｙｏｓ

ｔｏｒ　ＣＳ１０（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓカタログ０７９３０）及びＰｌａｓｍａｌｙｔｅ　Ａ（Ｂａｘｔｅｒカタログ２Ｂ２５２２Ｘ）の１：１製剤中で将来の使用のために凍結保存した。Ｔ細胞編集を開始する前日に、細胞を解凍し、Ｔ細胞活性化培地（ＴＣＡＭ）：ＣＴＳ　ＯｐＴｍｉｚｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、カタログＡ３７０５００１）（２．５％ヒトＡＢ血清（Ｇｅｍｉｎｉ、カタログ１００－５１２）、１Ｘ　ＧｌｕｔａＭＡＸ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、カタログ３５０５００６１）、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、カタログ１５６３００８０）、２００Ｕ／ｍＬのＩＬ－２（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－０２）、ＩＬ－７（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－０７）、ＩＬ－１５（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－１５）を補充した）中で一晩静置した。

【０２２３】

７．２．ＬＮＰ処理及びＴ細胞の増殖

１日目に、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びＴＲＢＣを標的とするｓｇＲＮＡを含有するＬＮＰ（Ｇ０１６２３９）を、１ｕｇ／ｍＬのｒｈＡｐｏＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ３５０－０２）を含有するＴＣＡＭ中で５ｕｇ／ｍＬの濃度でインキュベートした。一方、Ｔ細胞を採取し、洗浄し、ヒト試薬であるＴ細胞ＴｒａｎｓＡｃｔ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、カタログ１３０－１１１－１６０）を１：５０の希釈でＴＣＡＭ中に2×10^{6}細胞／ｍＬの密度で再懸濁した。Ｔ細胞及びＬＮＰ－ＡｐｏＥ培地を１：１の比で混合し、Ｔ細胞を培養フラスコ中で一晩プレーティングした。

【０２２４】

３日目に、Ｔ細胞を採取し、洗浄し、ＴＣＡＭ中に1×10^{6}細胞／ｍＬの密度で再懸濁した。Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びＴＲＡＣを標的とするｓｇＲＮＡを含有するＬＮＰ（Ｇ０１３００６）を、５ｕｇ／ｍＬのｒｈＡｐｏＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ３５０－０２）を含有するＴＣＡＭ中で５ｕｇ／ｍＬの濃度でインキュベートした。Ｔ細胞及びＬＮＰ－ＡｐｏＥ培地を１：１の比で混合し、Ｔ細胞を培養フラスコ中でプレーティングした。次いで、ＷＴ１　ＴＣＲを含有するＡＡＶを、3×10^{5}ゲノムコピー／細胞のＭＯＩで各群に添加した。これらの編集を有する細胞は、表及び図において「ＷＴ１　Ｔ細胞」と称される。

【０２２５】

４日目に、Ｔ細胞を採取し、洗浄し、ＴＣＡＭ中に1×10^{6}細胞／ｍＬの密度で再懸濁した。Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及び表９に列挙されるｇＲＮＡのうちの１つを含有するＬＮＰ。ＬＮＰを、５ｕｇ／ｍＬのｒｈＡｐｏＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ３５０－０２）を含有するＴＣＡＭ中で５ｕｇ／ｍＬの濃度でインキュベートした。次いで、ＬＮＰ－ＡｐｏＥ溶液を、１：１の比で適切な培養物に添加した。

【０２２６】

５～１１日目に、Ｔ細胞を、Ｔ細胞増殖培地（ＴＣＥＭ）：ＣＴＳ　ＯｐＴｍｉｚｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、カタログＡ３７０５００１）（５％　ＣＴＳ免疫細胞血清置換（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、カタログＡ２５９６１０１）、１Ｘ　ＧｌｕｔａＭＡＸ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、カタログ３５０５００６１）、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、カタログ１５６３００８０）、２００Ｕ／ｍＬのＩＬ－２（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－０２）、ＩＬ－７（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－０７）、及びＩＬ－１５（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－１５））中の２４ウェルＧＲＥＸプレート（Ｗｉｌｓｏｎ　Ｗｏｌｆ、カタログ８０１９２）に移した。製造者のプロトコルに従って、細胞を増殖した。Ｔ細胞を６日間拡張し、培地を１日おきに交換した。細胞を、Ｖｉ－ＣＥＬＬ細胞計数器（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）を使用して計数し、全ての試料が類似した倍率拡張を示した。

【０２２７】

７．３．フローサイトメトリー及びＮＧＳによるＴ細胞編集の定量化

拡張後、編集されたＴ細胞をフローサイトメトリーによってアッセイして、ＴＣＲ挿入及びメモリー細胞表現型を決定した。Ｔ細胞を、以下の分子を標的とする抗体カクテルと

ともにインキュベートした。ＣＤ４（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３００５２４）、ＣＤ８（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３０１０４５）、Ｖｂ８（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３４８１０６）、ＣＤ３（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３００３２７）、ＣＤ６２Ｌ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３０４８４４）、ＣＤ４５ＲＯ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３０４２３０）、ＣＣＲ７（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３５３２１４）、及びＣＤ４５ＲＡ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３０４１０６）。その後、細胞をＣｙｔｏｆｌｅｘ　ＬＸ装置（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）で処理し、データを、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアパッケージを使用して分析した。

【０２２８】

連続Ｔ細胞操作後に関連する細胞表面タンパク質を発現する細胞のパーセンテージを、表８Ａ～８Ｃ及び図５Ａ～５Ｃに示す。表８Ａは、Ｔ細胞操作後のＣＤ８＋細胞の総パーセンテージ、及びＶｂ８抗体で検出された、操作されたＴＣＲを発現するＣＤ８＋またはＣＤ４＋細胞の割合を示す。表８Ｂ及び図５Ａは、幹細胞メモリー表現型（Ｔｓｃｍ；ＣＤ４５ＲＡ＋ＣＤ６２Ｌ＋）を有するＣＤ８＋Ｖｂ８＋細胞のパーセンテージを示す。表８Ｃ及び図５Ｂは、中央メモリー細胞表現型（Ｔｃｍ；ＣＤ４５ＲＯ＋ＣＤ６２Ｌ＋）を有するＣＤ８＋Ｖｂ８＋細胞のパーセンテージを示す。表８Ｃ及び図５Ｃは、エフェクターメモリー表現型（Ｔｅｍ；ＣＤ４５ＲＯ＋ＣＤ６２Ｌ－ＣＣＲ７－）を有する全細胞のパーセンテージを示す。フローサイトメトリー分析に加えて、実施例１に記載されるようにゲノムＤＮＡを調製し、ＮＧＳ分析を実施して、各標的部位における編集速度を決定した。表９及び図６Ａ～６Ｂは、第３の連続編集で操作された遺伝子座におけるインデル頻度の結果を示す。

【表１３】

表８Ａ－指定した表面タンパク質を発現する細胞の割合。

	合計での%CD8+		CD8+での%Vb8+		CD4+での%Vb8+	
試料	平均値	ＳＤ	平均値	ＳＤ	平均値	ＳＤ
WT1 Ｔ細胞	57.77	7.95	57.87	5.02	62.63	5.17
G018434	57.67	8.66	58.27	5.65	64.50	5.81

【表１４】

表８Ｂ－幹細胞メモリー表現型を有するＶｂ８＋ＣＤ８＋細胞の割合

	% CD45RA+ CD62L+ CCR7+		% CD45RA+ CD62L+ CCR7-	
試料	平均値	ＳＤ	平均値	ＳＤ
WT1 Ｔ細胞	13.64	12.95	15.88	12.61
G018434	12.20	11.12	18.45	14.10

【表１５】

表８Ｃ－中央記憶細胞表現型またはエフェクター記憶細胞表現型を有するＶｂ８＋ＣＤ８＋細胞の割合。

	%CD45RO+ CD62L+ CCR7+		%CD45RO+ CD62L+ CCR7-		%CD45RO+ CD62L- CCR7-	
試料	平均値	ＳＤ	平均値	ＳＤ	平均値	ＳＤ
WT1 T細胞	3.48	1.70	17.73	7.12	36.67	24.49
G018434	3.00	1.37	17.30	6.61	35.10	23.14

【表１６】

表９－３回目の逐次編集で操作された遺伝子のインデル頻度

	プライマーセット1			プライマーセット2		
試料	平均値	ＳＤ	n	平均値	ＳＤ	n
G018434 [LAG3]	0.99	0.00	2	0.99	0.00	3
G018436 [TIM3]	0.83	0.06	2	0.85	0.05	3
G020845 [TIM3]	0.92	0.01	2	0.88	0.05	3
G021215 [2B4]	データ無し			0.58	0.06	3
G021216 [2B4]	0.61	0.06	2	0.63	0.05	3

【０２２９】

実施例８－操作されたＴ細胞を使用したＡＭＬ細胞の増殖の阻害

チェックポイント阻害剤は、がんなどの増殖性障害において生じ得る免疫消耗と関連付けられる。ＷＴ１に関連する増殖性障害としては、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）及び慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）を含む多数の血液悪性腫瘍が挙げられる。チェックポイント阻害剤の発現を低減し、ＷＴ１　ＴＣＲの発現を誘導するために実施例７の方法によって調製した細胞を、インビトロ及びインビボの両方の既知のＡＭＬモデルを使用して試験する（例えば、Ｚｈｏｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ（２００９）１１４：３７９３－３８０２を参照のこと）。

【０２３０】

インビトロ細胞死滅アッセイを使用して、異常な増殖を有する細胞に対するＴ細胞の活性を検出することができる。実施例７の方法によって調製されたＴ細胞が標的細胞を排除する能力は、操作されたＴ細胞を、ＷＴ１抗原の高発現を伴う急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）由来の原発性白血病芽球（ＣＤ３３＋細胞）と共培養することによって評価される。白血病芽球は、例えば、実施例９と同様にアッセイすることができる。

【０２３１】

ヒトＷＴ１発現ＡＭＬ細胞株を、０日目に致死用量で静脈内経路を介してマウスに注射する。実施例７の方法によって調製した細胞を、１４日目に静脈内投与する。マウスの生存をモニターする。ＷＴ１　ＴＣＲを発現するように操作されたＴ細胞で処置されたマウスは、ＷＴ１　ＴＣＲを発現しないＴ細胞で処置されたマウスよりも長く生存可能である。ＷＴ１　ＴＣＲの発現に加えて、チェックポイント阻害剤の発現を阻害するように操作されたＴ細胞で処置されたマウスは、ＷＴ１　ＴＣＲ及び全ての内因性チェックポイント阻害剤を発現するＴ細胞で処置されたマウスよりも長く生存可能である。

【０２３２】

実施例９－操作されたＴ細胞による標的細胞死滅

実施例７で操作したＴ細胞を、Ｉｎｃｕｃｙｔｅ Ｌｉｖｅ Ｉｍａｇｉｎｇシステムを使用して、原発性白血病芽球を殺傷する能力について評価した。簡潔に述べると、Ｔ細胞を操作して、ＷＴ１ ＴＣＲをＴＲＡＣ遺伝子座に挿入し、２つのＴ細胞ドナー試料（ＷＴ１ Ｔ細胞）中のＴＲＢＣ遺伝子座をノックアウトした。第３の操作ステップでは、いくつかのＷＴ１ Ｔ細胞を、Ｇ０１８４３４を使用してＬＡＧ３をノックアウトするように処理した。３人のＨＬＡ－Ａ＊０２：０１患者から採取したＷＴ１を発現する原発性白血病芽球を、生細胞核標識用のＮｕｃＬｉｇｈｔ Ｒａｐｉｄ Ｒｅｄ試薬（Ｅｓｓｅｎ Ｂｉｏｓｃｅｎｃｅｓ）で標識し、カスパーゼ３／７緑色試薬の存在下で、異なる（５：１、１：１、及び１：５）のエフェクター対標的（Ｅ：Ｔ）比で操作されたリンパ球と共培養した。Ｅ：Ｔ比５：１の場合は、２万芽球、Ｅ：Ｔ比１：１及び１：５の場合では、７５，０００芽球を使用した。共培養物を、５％のＦＢＳ、１％のペニシリン－ストレプトマイシン（ＢｉｏＷｈｉｔｔａｋｅｒ／Ｌｏｎｚａ）、２ｍＭのグルタミン（ＢｉｏＷｈｉｔｔａｋｅｒ／Ｌｏｎｚａ）、１μｇ／ｍＬのＣＤ２８モノクローナル抗体（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）、Ｇ－ＣＳＦ及びＩＬ－３（２０ｎｇ／ｍＬ、Ｂｉｏ－ｔｅｃｈｎｅ）を補充したＸ－ＶＩＶＯ中の平底９６ウェルプレートに播種した。画像を６０分ごとに撮影し、赤色標的細胞中の緑色蛍光カスパーゼ３／７シグナルを、Ｉｎｃｕｃｙｔｅ Ｌｉｖｅ－Ｃｅｌｌ Ｉｍａｇｉｎｇ ａｎｄ Ａｎａｌｙｓｉｓソフトウェア（Ｅｓｓｅｎ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して定量化した。このアッセイでは、生きたＡＭＬ細胞は赤色のみで蛍光を発するが、死んだＡＭＬ細胞は赤色及び緑色の両方で蛍光を発する。表１０及び図７Ａ～Ｉは、緑色及び赤色の両方で蛍光を発する各画像（ｕｍ２／画像）の平均面積の平均±ＳＥＭを示す。各エフェクター集団について、上記のように、２つの異なるＴ細胞ドナーからの操作された細胞を使用した。

【表１７－１】

表１０－ＷＴ１発現ＡＭＬ細胞を、操作したＴ細胞に曝露した後での緑色と赤色の両方で蛍光を発するそれぞれの画像（ｕｍ^2／画像）の平均面積

			AML のみ		WT1 T 細胞		G018434	
細胞	E:T	時間(時間)	平均値	ＳＤ	平均値	ＳＤ	平均値	ＳＤ
pAML1	1:5	1	3354	425	3558	1253	3865	1433
pAML1	1:5	2	4950	59	5246	986	5631	880
pAML1	1:5	3	6025	567	6879	69	7789	1046
pAML1	1:5	4	6558	1074	8320	644	9872	152
pAML1	1:5	5	7545	1341	9755	2081	11461	713
pAML1	1:5	6	7666	2215	10902	2883	12593	1372
pAML1	1:5	7	7752	2651	11272	3548	12916	1983
pAML1	1:5	8	8092	2428	11439	2987	12541	1507
pAML1	1:5	9	8082	2776	11135	3449	12153	1907
pAML1	1:5	10	7993	2486	10709	3038	11675	1259
pAML1	1:5	11	8056	2822	10507	2363	11459	774
pAML1	1:5	12	8169	3029	9784	2530	10380	1020
pAML1	1:5	13	8012	3644	9293	2710	9557	1061
pAML1	1:5	14	7859	3600	8941	2398	9211	762
pAML1	1:5	15	7449	4138	8363	2053	8529	455
pAML1	1:5	16	7051	3838	7641	2231	7875	320
pAML1	1:5	17	6789	3482	7049	2066	7246	255
pAML1	1:5	18	6541	3407	6760	1893	6805	88
pAML1	1:5	19	6298	3571	6229	2005	6467	13
pAML1	1:5	20	5860	3227	5748	1623	5932	89
pAML1	1:5	21	5739	3232	5509	1603	5476	113
pAML1	1:5	22	5486	3336	4638	130	5580	370
pAML1	1:5	23	5048	3561	5171	1804	5201	40
pAML1	1:5	24	4875	3090	4682	1375	4641	45
pAML1	1:1	0	2827	509	13236	792	15194	6678
pAML1	1:1	1	3354	425	13804	5477	19700	10903
pAML1	1:1	2	4950	59	19052	5728	27535	13626
pAML1	1:1	3	6025	567	26223	6816	38197	15826
pAML1	1:1	4	6558	1074	35499	4617	54205	17599
pAML1	1:1	5	7545	1341	45746	2096	66773	13027
pAML1	1:1	6	7666	2215	53641	2027	74720	8108
pAML1	1:1	7	7752	2651	56628	3269	80989	6238

【表１７－２】

			AMLのみ		WT1 T細胞		G018434	
細胞	E:T	時間(時間)	平均値	ＳＤ	平均値	ＳＤ	平均値	ＳＤ
pAML1	1:1	8	8092	2428	61273	4878	83580	7844
pAML1	1:1	9	8082	2776	60981	3635	83207	6463
pAML1	1:1	10	7993	2486	61917	4229	84022	8033
pAML1	1:1	11	8056	2822	61609	2905	82642	9299
pAML1	1:1	12	8169	3029	61417	3408	80962	8914
pAML1	1:1	13	8012	3644	59798	1717	77608	9537
pAML1	1:1	14	7859	3600	59052	2513	76300	11155
pAML1	1:1	15	7449	4138	57879	1056	74709	11978
pAML1	1:1	16	7051	3838	54344	223	71536	10860
pAML1	1:1	17	6789	3482	53236	871	68877	11648
pAML1	1:1	18	6541	3407	51299	1296	67389	12000
pAML1	1:1	19	6298	3571	50863	1123	65897	12281
pAML1	1:1	20	5860	3227	49140	509	63785	12535
pAML1	1:1	21	5739	3232	49144	560	61051	12487
pAML1	1:1	22	5486	3336	48020	1809	58750	9309
pAML1	1:1	23	5048	3561	45640	2347	55942	4114
pAML1	1:1	24	4875	3090	44944	1257	57469	8462
pAML1	5:1	0	260	94	11330	5133	10383	7093
pAML1	5:1	1	429	220	13196	4743	13169	9428
pAML1	5:1	2	627	209	19065	4442	18910	11413
pAML1	5:1	3	776	151	27606	4557	27727	14947
pAML1	5:1	4	908	160	39114	1808	37391	14496
pAML1	5:1	5	915	198	50163	2145	46082	13297
pAML1	5:1	6	952	211	57449	4329	52019	12750
pAML1	5:1	7	911	254	61267	6398	54150	11088
pAML1	5:1	8	1029	293	63554	4397	54533	13450
pAML1	5:1	9	1029	387	63260	3866	53782	13379
pAML1	5:1	10	1037	420	61830	3055	50826	12276
pAML1	5:1	11	1132	485	61700	1135	50799	16311
pAML1	5:1	12	1180	540	60149	442	48119	14262
pAML1	5:1	13	1140	562	57421	409	45843	14799
pAML1	5:1	14	1166	592	56596	2191	43050	15285
pAML1	5:1	15	1119	613	54439	3881	42112	16153

【表１７－３】

			AML のみ		WT1 T 細胞		G018434	
細胞	E:T	時間(時間)	平均値	ＳＤ	平均値	ＳＤ	平均値	ＳＤ
pAML1	5:1	16	985	492	52113	4265	37991	13233
pAML1	5:1	17	984	510	50843	6004	37983	14986
pAML1	5:1	18	874	487	49954	6454	37026	15740
pAML1	5:1	19	816	422	47822	6412	35339	15240
pAML1	5:1	20	775	463	47665	7717	33865	14839
pAML1	5:1	21	780	474	46969	7606	33299	15107
pAML1	5:1	22	768	523	46262	11319	32617	16130
pAML1	5:1	23	661	352	41513	4150	29345	11086
pAML1	5:1	24	639	353	42152	6450	30030	13727
pAML2	1:5	1	5874	3593	-128	7179	-1144	8250
pAML2	1:5	2	8990	2303	4735	8794	4066	7288
pAML2	1:5	3	10952	2796	8464	9292	9197	6863
pAML2	1:5	4	10432	5484	12167	7231	13739	5140
pAML2	1:5	5	10817	4334	16482	4777	18762	3923
pAML2	1:5	6	11265	6212	21199	2227	22715	847
pAML2	1:5	7	10492	7822	22442	1160	24862	1272
pAML2	1:5	8	10232	6164	23501	1059	25094	1193
pAML2	1:5	9	10518	7563	24885	2627	25575	3193
pAML2	1:5	10	9472	7470	24114	3122	25168	3787
pAML2	1:5	11	9351	8653	23935	5093	24267	3978
pAML2	1:5	12	8614	8981	23349	4417	23047	4748
pAML2	1:5	13	8045	8457	21814	5360	21830	5412
pAML2	1:5	14	6364	8590	20406	4731	20024	4979
pAML2	1:5	15	5270	9421	18965	4726	18167	4633
pAML2	1:5	16	3744	9415	17229	5532	15951	6157
pAML2	1:5	17	1725	8950	15487	5228	14246	5223
pAML2	1:5	18	763	9149	13494	5668	12139	4973
pAML2	1:5	19	-606	8876	11518	5824	10427	5286
pAML2	1:5	20	-1906	8549	9623	4578	8578	4849
pAML2	1:5	21	-3578	8225	8117	5170	6905	4630
pAML2	1:5	22	-3438	6448	6284	4824	4313	5875

【表１７－４】

			AML のみ		WT1 T 細胞		G018434	
細胞	E:T	時間(時間)	平均値	ＳＤ	平均値	ＳＤ	平均値	ＳＤ
pAML2	1:5	23	-3948	9503	4222	8373	1348	8945
pAML2	1:5	24	-5862	8226	1826	6660	-498	6927
pAML2	1:1	0	2827	509	13236	792	15194	6678
pAML2	1:1	1	3354	425	13804	5477	19700	10903
pAML2	1:1	2	4950	59	19052	5728	27535	13626
pAML2	1:1	3	6025	567	26223	6816	38197	15826
pAML2	1:1	4	6558	1074	35499	4617	54205	17599
pAML2	1:1	5	7545	1341	45746	2096	66773	13027
pAML2	1:1	6	7666	2215	53641	2027	74720	8108
pAML2	1:1	7	7752	2651	56628	3269	80989	6238
pAML2	1:1	8	8092	2428	61273	4878	83580	7844
pAML2	1:1	9	8082	2776	60981	3635	83207	6463
pAML2	1:1	10	7993	2486	61917	4229	84022	8033
pAML2	1:1	11	8056	2822	61609	2905	82642	9299
pAML2	1:1	12	8169	3029	61417	3408	80962	8914
pAML2	1:1	13	8012	3644	59798	1717	77608	9537
pAML2	1:1	14	7859	3600	59052	2513	76300	11155
pAML2	1:1	15	7449	4138	57879	1056	74709	11978
pAML2	1:1	16	7051	3838	54344	223	71536	10860
pAML2	1:1	17	6789	3482	53236	871	68877	11648
pAML2	1:1	18	6541	3407	51299	1296	67389	12000
pAML2	1:1	19	6298	3571	50863	1123	65897	12281
pAML2	1:1	20	5860	3227	49140	509	63785	12535
pAML2	1:1	21	5739	3232	49144	560	61051	12487
pAML2	1:1	22	5486	3336	48020	1809	58750	9309
pAML2	1:1	23	5048	3561	45640	2347	55942	4114
pAML2	1:1	24	4875	3090	44944	1257	57469	8462
pAML2	5:1	0	8544	6060	28453	4417	30682	6113
pAML2	5:1	1	5486	2264	25864	6247	28717	17226
pAML2	5:1	2	5389	2108	34805	5246	37294	19089
pAML2	5:1	3	5464	1824	45856	4647	52389	26964

【表１７－５】

			AML のみ		WT1 T 細胞		G018434	
細胞	E:T	時間(時間)	平均値	ＳＤ	平均値	ＳＤ	平均値	ＳＤ
pAML2	5:1	4	5618	1740	63955	154	71604	32338
pAML2	5:1	5	5707	1704	81405	8675	90561	33792
pAML2	5:1	6	5933	1616	96371	19045	107698	36546
pAML2	5:1	7	5794	1747	104357	24148	114853	32752
pAML2	5:1	8	5951	1493	110958	27899	121794	36525
pAML2	5:1	9	5951	1635	112764	28875	124586	37679
pAML2	5:1	10	5812	1582	114032	27647	126614	39621
pAML2	5:1	11	5923	1592	114965	26691	127047	42637
pAML2	5:1	12	5652	1846	115372	26562	124228	40799
pAML2	5:1	13	5699	1742	115277	23959	123311	41800
pAML2	5:1	14	5540	1738	112945	21372	121853	47137
pAML2	5:1	15	5410	1741	112218	22840	119511	45965
pAML2	5:1	16	5246	1920	110570	23432	116067	44018
pAML2	5:1	17	4937	1814	108018	20391	114444	46302
pAML2	5:1	18	4867	1720	107372	19439	111696	45180
pAML2	5:1	19	4613	1713	105140	19053	108696	42307
pAML2	5:1	20	4545	1686	103490	15295	106840	45485
pAML2	5:1	21	4424	1608	101914	15531	103516	42626
pAML2	5:1	22	4503	1393	97216	3580	104422	46692
pAML2	5:1	23	4421	1496	102070	16516	100893	38756
pAML2	5:1	24	4147	1398	97400	12875	95829	39164
pAML3	1:5	1	12582	3249	10361	2988	13450	1776
pAML3	1:5	2	15298	4803	13869	4097	17261	952
pAML3	1:5	3	18963	6429	18221	5604	21985	2753
pAML3	1:5	4	22457	6780	23222	5874	27755	2390
pAML3	1:5	5	24776	6067	27676	5023	32400	1324
pAML3	1:5	6	25600	4957	30200	3609	35033	213
pAML3	1:5	7	24996	4617	30785	2581	34896	160
pAML3	1:5	8	24152	3733	31237	943	35432	1377
pAML3	1:5	9	23057	3264	30090	757	33099	725
pAML3	1:5	10	21695	3120	29159	79	31556	864

【表１７－６】

			AML のみ		WT1 T 細胞		G018434	
細胞	E:T	時間(時間)	平均値	ＳＤ	平均値	ＳＤ	平均値	ＳＤ
pAML3	1:5	11	20472	2724	27871	360	30172	1208
pAML3	1:5	12	19238	2457	25938	12	28323	1825
pAML3	1:5	13	17694	2026	24060	494	26137	2181
pAML3	1:5	14	16470	2080	22555	726	24557	2139
pAML3	1:5	15	15310	1591	21151	24	22643	1869
pAML3	1:5	16	14109	1249	19708	143	21277	2248
pAML3	1:5	17	12846	1490	18351	61	19737	1842
pAML3	1:5	18	11779	1441	16742	130	18294	2102
pAML3	1:5	19	10918	885	15463	357	16843	1716
pAML3	1:5	20	10100	1021	14204	233	15522	1714
pAML3	1:5	21	9347	760	13434	171	14620	2192
pAML3	1:5	22	8605	960	11888	589	12919	3069
pAML3	1:5	23	7917	111	10922	1673	11988	3916
pAML3	1:5	24	7298	494	9859	1286	10974	3994
pAML3	1:1	0	68259	25727	97207	18214	99268	11650
pAML3	1:1	1	55874	3593	86234	13603	84335	21749
pAML3	1:1	2	58990	2303	100750	10127	101768	22106
pAML3	1:1	3	60952	2796	121403	6229	121378	24160
pAML3	1:1	4	60432	5484	139119	1211	146801	22198
pAML3	1:1	5	60817	4334	165467	14640	177736	15958
pAML3	1:1	6	61265	6212	189110	28702	202164	2650
pAML3	1:1	7	60492	7822	203695	40458	218625	5759
pAML3	1:1	8	60232	6164	216221	47755	233022	14611
pAML3	1:1	9	60518	7563	225326	55164	239473	21050
pAML3	1:1	10	59472	7470	229487	63218	245910	23578
pAML3	1:1	11	59351	8653	231348	60991	246588	24195
pAML3	1:1	12	58614	8981	233469	62597	244765	30089
pAML3	1:1	13	58045	8457	232452	63694	244950	29428
pAML3	1:1	14	56364	8590	230905	58826	242654	27265
pAML3	1:1	15	55270	9421	227313	59089	240076	30689
pAML3	1:1	16	53744	9415	224262	58529	234441	30991

【表１７－７】

			AMLのみ		WT1 T細胞		G018434	
細胞	E:T	時間(時間)	平均値	ＳＤ	平均値	ＳＤ	平均値	ＳＤ
pAML3	1:1	17	51725	8950	219496	54219	230176	26605
pAML3	1:1	18	50763	9149	214232	55788	223835	27128
pAML3	1:1	19	49394	8876	210735	51467	219440	25391
pAML3	1:1	20	48094	8549	208073	50046	214170	23696
pAML3	1:1	21	46422	8225	203897	48794	209062	21152
pAML3	1:1	22	46562	6448	204648	40380	208991	14888
pAML3	1:1	23	46052	9503	200231	49006	204352	25984
pAML3	1:1	24	44138	8226	193355	41211	196535	21111
pAML3	5:1	0	1497	181	16645	4286	18192	9755
pAML3	5:1	1	1057	557	17905	8072	19206	14762
pAML3	5:1	2	1365	689	23199	9299	24441	16289
pAML3	5:1	3	1787	743	31499	12103	33240	20906
pAML3	5:1	4	2038	587	42510	11975	45169	24094
pAML3	5:1	5	2242	301	51711	11057	54997	23214
pAML3	5:1	6	2197	121	58555	7821	60579	21166
pAML3	5:1	7	2117	38	61037	5875	62009	18896
pAML3	5:1	8	1914	40	60639	5195	61627	18609
pAML3	5:1	9	1780	67	60299	6339	59008	18087
pAML3	5:1	10	1591	112	58519	7213	57478	18803
pAML3	5:1	11	1470	121	56218	7214	54658	17888
pAML3	5:1	12	1327	83	53737	7027	51337	17928
pAML3	5:1	13	1217	153	52654	7676	48883	18902
pAML3	5:1	14	1093	140	50252	8369	47392	20334
pAML3	5:1	15	1025	139	47335	7062	44515	18821
pAML3	5:1	16	940	165	45286	7436	42214	17649
pAML3	5:1	17	867	151	43601	8013	40924	18384
pAML3	5:1	18	796	137	42304	7789	38065	16036
pAML3	5:1	19	743	157	41231	7661	37443	16330
pAML3	5:1	20	678	128	38692	6746	36358	17251
pAML3	5:1	21	641	85	37339	6557	34832	17097
pAML3	5:1	22	578	83	36893	7383	33911	16892
pAML3	5:1	23	513	112	34432	3912	31524	11745
pAML3	5:1	24	485	93	33681	5254	30508	12417

【０２３３】

実施例９－さらなる実施形態

実施形態１は、ｃｈｒ１２．６７７２４８３－６７７８４５５のゲノム座標内に、ヒトＬＡＧ３配列における遺伝子修飾を含む、操作された細胞である。

【０２３４】

実施形態２は、当該遺伝子修飾が、挿入、欠失、及び置換から選択される、実施形態１に記載の操作された細胞である。

【０２３５】

実施形態３は、当該遺伝子修飾が、当該ＬＡＧ３遺伝子の発現を阻害する、実施形態１

または２に記載の操作された細胞である。

【０２３６】

実施形態４は、当該遺伝子修飾が、以下から選択されるゲノム座標：

【表１８】

ＬＡＧ３番号	ゲノム座標　（ｈｇ３８）
ＬＡＧ３－１	ｃｈｒ１２：６７７３９３８－６７７３９５８
ＬＡＧ３－２	ｃｈｒ１２：６７７４６７８－６７７４６９８
ＬＡＧ３－３	ｃｈｒ１２：６７７２８９４－６７７２９１４
ＬＡＧ３－４	ｃｈｒ１２：６７７４８１６－６７７４８３６
ＬＡＧ３－５	ｃｈｒ１２：６７７４７４２－６７７４７６２
ＬＡＧ３－６	ｃｈｒ１２：６７７５３８０－６７７５４００
ＬＡＧ３－７	ｃｈｒ１２：６７７４７２７－６７７４７４７
ＬＡＧ３－８	ｃｈｒ１２：６７７４７３２－６７７４７５２
ＬＡＧ３－９	ｃｈｒ１２：６７７７４３５－６７７７４５５
ＬＡＧ３－１０	ｃｈｒ１２：６７７４７７１－６７７４７９１
ＬＡＧ３－１１	ｃｈｒ１２：６７７２９０９－６７７２９２９
ＬＡＧ３－１２	ｃｈｒ１２：６７７４７３５－６７７４７５５
ＬＡＧ３－１３	ｃｈｒ１２：６７７３７８３－６７７３８０３
ＬＡＧ３－１４	ｃｈｒ１２：６７７５２９２－６７７５３１２
ＬＡＧ３－１５	ｃｈｒ１２：６７７７４３３－６７７７４５３
ＬＡＧ３－１６	ｃｈｒ１２：６７７８２６８－６７７８２８８
ＬＡＧ３－１７	ｃｈｒ１２：６７７５４４４－６７７５４６４
ＬＡＧ３－２４	ｃｈｒ１２：６７７７７８３－６７７７８０３
ＬＡＧ３－２６	ｃｈｒ１２：６７７７７８４－６７７７８０４
ＬＡＧ３－４１	ｃｈｒ１２：６７７８２５２－６７７８２７２
ＬＡＧ３－５９	ｃｈｒ１２：６７７７３２５－６７７７３４５
ＬＡＧ３－８３	ｃｈｒ１２：６７７７３２９－６７７７３４９

または

ＬＡＧ３－１～ＬＡＧ３－１５：ＬＡＧ３－１～ＬＡＧ３－１１：ＬＡＧ３－１～ＬＡＧ３－４：またはＬＡＧ３－１、ＬＡＧ３－４、ＬＡＧ３－５、及びＬＡＧ３－９によって標的とされるものから選択されるゲノム座標である、実施形態１～３のいずれか１つに記載の操作された細胞である。

【０２３７】

実施形態５は、当該操作された細胞が、内因性Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）配列のゲノム座標内の遺伝子修飾を含み、当該遺伝子修飾が、ＴＣＲ遺伝子の発現を阻害する、実施形態１～４のいずれか１項に記載の操作された細胞である。

【０２３８】

実施形態６は、当該ＴＣＲ遺伝子が、ＴＲＡＣまたはＴＲＢＣである、実施形態５に記載の操作された細胞である。

【０２３９】

実施形態７は、以下：

【表１９－１】

ＴＲＢＣ番号：	ゲノム座標　（ｈｇ３８）
ＴＲＢＣ－１	ｃｈｒ７：１４２７９１９９６－１４２７９２０１６
ＴＲＢＣ－２	ｃｈｒ７：１４２７９２０４７－１４２７９２０６７
ＴＲＢＣ－３	ｃｈｒ７：１４２７９２００８－１４２７９２０２８
ＴＲＢＣ－４	ｃｈｒ７：１４２７９１９３１－１４２７９１９５１
ＴＲＢＣ－５	ｃｈｒ７：１４２７９１９３０－１４２７９１９５０
ＴＲＢＣ－６	ｃｈｒ７：１４２７９１７４８－１４２７９１７６８
ＴＲＢＣ－７	ｃｈｒ７：１４２７９１７２０－１４２７９１７４０
ＴＲＢＣ－８	ｃｈｒ７：１４２７９２０４１－１４２７９２０６１
ＴＲＢＣ－９	ｃｈｒ７：１４２８０２１１４－１４２８０２１３４
ＴＲＢＣ－１０	ｃｈｒ７：１４２７９２００９－１４２７９２０２９
ＴＲＢＣ－１１	ｃｈｒ７：１４２７９２６９７－１４２７９２７１７
ＴＲＢＣ－１２	ｃｈｒ７：１４２７９１９６３－１４２７９１９８３
ＴＲＢＣ－１３	ｃｈｒ７：１４２７９１９７６－１４２７９１９９６
ＴＲＢＣ－１４	ｃｈｒ７：１４２７９１９７４－１４２７９１９９４
ＴＲＢＣ－１５	ｃｈｒ７：１４２７９１９７０－１４２７９１９９０
ＴＲＢＣ－１６	ｃｈｒ７：１４２７９１９４８－１４２７９１９６８
ＴＲＢＣ－１７	ｃｈｒ７：１４２７９１９１３－１４２７９１９３３
ＴＲＢＣ－１８	ｃｈｒ７：１４２７９１９６１－１４２７９１９８１
ＴＲＢＣ－１９	ｃｈｒ７：１４２７９２０６８－１４２７９２０８８
ＴＲＢＣ－２０	ｃｈｒ７：１４２７９１９７５－１４２７９１９９５
ＴＲＢＣ－２１	ｃｈｒ７：１４２７９１７７３－１４２７９１７９３
ＴＲＢＣ－２２	ｃｈｒ７：１４２７９１９１９－１４２７９１９３９
ＴＲＢＣ－２３	ｃｈｒ７：１４２７９１８３４－１４２７９１８５４
ＴＲＢＣ－２４	ｃｈｒ７：１４２７９１８７８－１４２７９１８９８
ＴＲＢＣ－２５	ｃｈｒ７：１４２８０２１４１－１４２８０２１６１
ＴＲＢＣ－２６	ｃｈｒ７：１４２７９１８４４－１４２７９１８６４
ＴＲＢＣ－２７	ｃｈｒ７：１４２８０１１５４－１４２８０１１７４
ＴＲＢＣ－２８	ｃｈｒ７：１４２７９１９６１－１４２７９１９８１
ＴＲＢＣ－２９	ｃｈｒ７：１４２７９２００１－１４２７９２０２１
ＴＲＢＣ－３０	ｃｈｒ７：１４２７９１９７９－１４２７９１９９９
ＴＲＢＣ－３１	ｃｈｒ７：１４２７９２０４１－１４２７９２０６１
ＴＲＢＣ－３２	ｃｈｒ７：１４２７９２００３－１４２７９２０２３
ＴＲＢＣ－３３	ｃｈｒ７：１４２７９１９８４－１４２７９２００４
ＴＲＢＣ－３４	ｃｈｒ７：１４２７９２００２－１４２７９２０２２

【表１９－２】

ＴＲＢＣ番号：	ゲノム座標　（ｈｇ３８）
ＴＲＢＣ－３５	ｃｈｒ７：１４２７９１９６６－１４２７９１９８６
ＴＲＢＣ－３６	ｃｈｒ７：１４２７９２００７－１４２７９２０２７
ＴＲＢＣ－３７	ｃｈｒ７：１４２７９１９９３－１４２７９２０１３
ＴＲＢＣ－３８	ｃｈｒ７：１４２７９１９０２－１４２７９１９２２
ＴＲＢＣ－３９	ｃｈｒ７：１４２７９１７２４－１４２７９１７４４
ＴＲＢＣ－４０	ｃｈｒ７：１４２７９１９７３－１４２７９１９９３
ＴＲＢＣ－４１	ｃｈｒ７：１４２７９１９２０－１４２７９１９４０
ＴＲＢＣ－４２	ｃｈｒ７：１４２７９１９９４－１４２７９２０１４
ＴＲＢＣ－４３	ｃｈｒ７：１４２７９１８８７－１４２７９１９０７
ＴＲＢＣ－４４	ｃｈｒ７：１４２７９１９０７－１４２７９１９２７
ＴＲＢＣ－４５	ｃｈｒ７：１４２７９１９５２－１４２７９１９７２
ＴＲＢＣ－４６	ｃｈｒ７：１４２７９１７２１－１４２７９１７４１
ＴＲＢＣ－４７	ｃｈｒ７：１４２７９２７１８－１４２７９２７３８
ＴＲＢＣ－４８	ｃｈｒ７：１４２７９１７２９－１４２７９１７４９
ＴＲＢＣ－４９	ｃｈｒ７：１４２７９１９１１－１４２７９１９３１
ＴＲＢＣ－５０	ｃｈｒ７：１４２７９１８６７－１４２７９１８８７
ＴＲＢＣ－５１	ｃｈｒ７：１４２７９１８９９－１４２７９１９１９
ＴＲＢＣ－５２	ｃｈｒ７：１４２７９１７２７－１４２７９１７４７
ＴＲＢＣ－５３	ｃｈｒ７：１４２７９１９４９－１４２７９１９６９
ＴＲＢＣ－５４	ｃｈｒ７：１４２７９１９３３－１４２７９１９５３
ＴＲＢＣ－５５	ｃｈｒ７：１４２７９１９３２－１４２７９１９５２
ＴＲＢＣ－５６	ｃｈｒ７：１４２７９２０５７－１４２７９２０７７
ＴＲＢＣ－５７	ｃｈｒ７：１４２７９１９４０－１４２７９１９６０
ＴＲＢＣ－５８	ｃｈｒ７：１４２７９１７４７－１４２７９１７６７
ＴＲＢＣ－５９	ｃｈｒ７：１４２７９１８８１－１４２７９１９０１
ＴＲＢＣ－６０	ｃｈｒ７：１４２７９１７７９－１４２７９１７９９
ＴＲＢＣ－６１	ｃｈｒ７：１４２７９２０５４－１４２７９２０７４
ＴＲＢＣ－６２	ｃｈｒ７：１４２７９２０６９－１４２７９２０８９
ＴＲＢＣ－６３	ｃｈｒ７：１４２７９２７１２－１４２７９２７３２
ＴＲＢＣ－６４	ｃｈｒ７：１４２７９１７２９－１４２７９１７４９
ＴＲＢＣ－６５	ｃｈｒ７：１４２７９１８２１－１４２７９１８４１
ＴＲＢＣ－６６	ｃｈｒ７：１４２７９２０５２－１４２７９２０７２
ＴＲＢＣ－６７	ｃｈｒ７：１４２７９１９１６－１４２７９１９３６
ＴＲＢＣ－６８	ｃｈｒ７：１４２７９１８９９－１４２７９１９１９
ＴＲＢＣ－６９	ｃｈｒ７：１４２７９１７７２－１４２７９１７９２
ＴＲＢＣ－７０	ｃｈｒ７：１４２７９２７１４－１４２７９２７３４

【表１９－３】

ＴＲＢＣ番号：	ゲノム座標　（ｈｇ３８）
ＴＲＢＣ－７１	ｃｈｒ７：１４２７９２０４２－１４２７９２０６２
ＴＲＢＣ－７２	ｃｈｒ７：１４２７９１９６２－１４２７９１９８２
ＴＲＢＣ－７３	ｃｈｒ７：１４２７９１９８８－１４２７９２００８
ＴＲＢＣ－７４	ｃｈｒ７：１４２７９１９８２－１４２７９２００２
ＴＲＢＣ－７５	ｃｈｒ７：１４２７９２０４９－１４２７９２０６９
ＴＲＢＣ－７６	ｃｈｒ７：１４２７９１８３９－１４２７９１８５９
ＴＲＢＣ－７７	ｃｈｒ７：１４２７９１８９３－１４２７９１９１３
ＴＲＢＣ－７８	ｃｈｒ７：１４２７９１９４５－１４２７９１９６５
ＴＲＢＣ－７９	ｃｈｒ７：１４２７９１９６４－１４２７９１９８４
ＴＲＢＣ－８０	ｃｈｒ７：１４２７９１７５７－１４２７９１７７７
ＴＲＢＣ－８１	ｃｈｒ７：１４２７９２０４８－１４２７９２０６８
ＴＲＢＣ－８２	ｃｈｒ７：１４２７９１７７４－１４２７９１７９４
ＴＲＢＣ－８３	ｃｈｒ７：１４２７９２０４８－１４２７９２０６８
ＴＲＢＣ－８４	ｃｈｒ７：１４２７９１８３０－１４２７９１８５０
ＴＲＢＣ－８５	ｃｈｒ７：１４２７９１９０９－１４２７９１９２９
ＴＲＢＣ－８６	ｃｈｒ７：１４２７９１９１２－１４２７９１９３２
ＴＲＢＣ－８７	ｃｈｒ７：１４２７９１７６６－１４２７９１７８６
ＴＲＢＣ－８８	ｃｈｒ７：１４２７９１８８０－１４２７９１９００
ＴＲＢＣ－８９	ｃｈｒ７：１４２７９１９１９－１４２７９１９３９

から選択されるゲノム座標内にＴＲＢＣの遺伝子修飾を含む、実施形態６に記載の操作された細胞。

【０２４０】

実施形態８は、以下：

【表２０－１】

ＴＲＡＣ番号：	ゲノム座標　（ｈｇ３８）
ＴＲＡＣ－９０	ｃｈｒ１４：２２５４７５２４－２２５４７５４４
ＴＲＡＣ－９１	ｃｈｒ１４：２２５５０５８１－２２５５０６０１
ＴＲＡＣ－９２	ｃｈｒ１４：２２５５０６０８－２２５５０６２８
ＴＲＡＣ－９３	ｃｈｒ１４：２２５５０６１１－２２５５０６３１
ＴＲＡＣ－９４	ｃｈｒ１４：２２５５０６２２－２２５５０６４２
ＴＲＡＣ－９５	ｃｈｒ１４：２２５４７５２９－２２５４７５４９
ＴＲＡＣ－９６	ｃｈｒ１４：２２５４７５１２－２２５４７５３２
ＴＲＡＣ－９７	ｃｈｒ１４：２２５４７５２５－２２５４７５４５

【表２０－２】

ＴＲＡＣ番号：	ゲノム座標　（ｈｇ３８）
ＴＲＡＣ－９８	ｃｈｒ１４：２２５４７５３６－２２５４７５５６
ＴＲＡＣ－９９	ｃｈｒ１４：２２５４７５７５－２２５４７５９５
ＴＲＡＣ－１００	ｃｈｒ１４：２２５４７６４０－２２５４７６６０
ＴＲＡＣ－１０１	ｃｈｒ１４：２２５４７６４７－２２５４７６６７
ＴＲＡＣ－１０２	ｃｈｒ１４：２２５４７７７７－２２５４７７９７
ＴＲＡＣ－１０３	ｃｈｒ１４：２２５４９６３８－２２５４９６５８
ＴＲＡＣ－１０４	ｃｈｒ１４：２２５４９６４６－２２５４９６６６
ＴＲＡＣ－１０５	ｃｈｒ１４：２２５５０６００－２２５５０６２０
ＴＲＡＣ－１０６	ｃｈｒ１４：２２５５０６０５－２２５５０６２５
ＴＲＡＣ－１０７	ｃｈｒ１４：２２５５０６２５－２２５５０６４５
ＴＲＡＣ－１０８	ｃｈｒ１４：２２５３９１１６－２２５３９１３６
ＴＲＡＣ－１０９	ｃｈｒ１４：２２５３９１２０－２２５３９１４０
ＴＲＡＣ－１１０	ｃｈｒ１４：２２５４７５１８－２２５４７５３８
ＴＲＡＣ－１１１	ｃｈｒ１４：２２５３９０８２－２２５３９１０２
ＴＲＡＣ－１１２	ｃｈｒ１４：２２５３９０６１－２２５３９０８１
ＴＲＡＣ－１１３	ｃｈｒ１４：２２５３９０９７－２２５３９１１７
ＴＲＡＣ－１１４	ｃｈｒ１４：２２５４７６９７－２２５４７７１７
ＴＲＡＣ－１１５	ｃｈｒ１４：２２５５０５７１－２２５５０５９１
ＴＲＡＣ－１１６	ｃｈｒ１４：２２５５０６３１－２２５５０６５１
ＴＲＡＣ－１１７	ｃｈｒ１４：２２５５０６５８－２２５５０６７８
ＴＲＡＣ－１１８	ｃｈｒ１４：２２５４７７１２－２２５４７７３２
ＴＲＡＣ－１１９	ｃｈｒ１４：２２５５０６３６－２２５５０６５６
ＴＲＡＣ－１２０	ｃｈｒ１４：２２５５０６３６－２２５５０６５６
ＴＲＡＣ－１２１	ｃｈｒ１４：２２５５０５８２－２２５５０６０２
ＴＲＡＣ－１２２	ｃｈｒ１４：２２５５０６０６－２２５５０６２６
ＴＲＡＣ－１２３	ｃｈｒ１４：２２５５０６０９－２２５５０６２９
ＴＲＡＣ－１２４	ｃｈｒ１４：２２５４７６９１－２２５４７７１１
ＴＲＡＣ－１２５	ｃｈｒ１４：２２５４７５７６－２２５４７５９６
ＴＲＡＣ－１２６	ｃｈｒ１４：２２５４９６４８－２２５４９６６８
ＴＲＡＣ－１２７	ｃｈｒ１４：２２５４９６６０－２２５４９６８０
ＴＲＡＣ－１２８	ｃｈｒ１４：２２５４７７１６－２２５４７７３６
ＴＲＡＣ－１２９	ｃｈｒ１４：２２５４７５１４－２２５４７５３４
ＴＲＡＣ－１３０	ｃｈｒ１４：２２５５０６６２－２２５５０６８２
ＴＲＡＣ－１３１	ｃｈｒ１４：２２５５０５９３－２２５５０６１３
ＴＲＡＣ－１３２	ｃｈｒ１４：２２５５０６１２－２２５５０６３２
ＴＲＡＣ－１３３	ｃｈｒ１４：２２５４７５２１－２２５４７５４１

【表２０－３】

ＴＲＡＣ番号：	ゲノム座標　（ｈｇ３８）
ＴＲＡＣ－１３４	ｃｈｒ１４：２２５４７５４０－２２５４７５６０
ＴＲＡＣ－１３５	ｃｈｒ１４：２２５３９１２１－２２５３９１４１
ＴＲＡＣ－１３６	ｃｈｒ１４：２２５４７６３２－２２５４７６５２
ＴＲＡＣ－１３７	ｃｈｒ１４：２２５４７６７４－２２５４７６９４
ＴＲＡＣ－１３８	ｃｈｒ１４：２２５４９６４３－２２５４９６６３
ＴＲＡＣ－１３９	ｃｈｒ１４：２２５４７６５５－２２５４７６７５
ＴＲＡＣ－１４０	ｃｈｒ１４：２２５４７６６７－２２５４７６８７
ＴＲＡＣ－１４１	ｃｈｒ１４：２２５３９０８５－２２５３９１０５
ＴＲＡＣ－１４２	ｃｈｒ１４：２２５４９６３４－２２５４９６５４
ＴＲＡＣ－１４３	ｃｈｒ１４：２２５３９０６４－２２５３９０８４
ＴＲＡＣ－１４４	ｃｈｒ１４：２２５４７６３９－２２５４７６５９
ＴＲＡＣ－１４５	ｃｈｒ１４：２２５４７７３１－２２５４７７５１
ＴＲＡＣ－１４６	ｃｈｒ１４：２２５４７７３４－２２５４７７５４
ＴＲＡＣ－１４７	ｃｈｒ１４：２２５４７５９１－２２５４７６１１
ＴＲＡＣ－１４８	ｃｈｒ１４：２２５４７６５７－２２５４７６７７
ＴＲＡＣ－１４９	ｃｈｒ１４：２２５４７５１９－２２５４７５３９
ＴＲＡＣ－１５０	ｃｈｒ１４：２２５４９６７４－２２５４９６９４
ＴＲＡＣ－１５１	ｃｈｒ１４：２２５４７６７８－２２５４７６９８
ＴＲＡＣ－１５２	ｃｈｒ１４：２２５３９０８７－２２５３９１０７
ＴＲＡＣ－１５３	ｃｈｒ１４：２２５４７５９５－２２５４７６１５
ＴＲＡＣ－１５４	ｃｈｒ１４：２２５４７６３３－２２５４７６５３
ＴＲＡＣ－１５５	ｃｈｒ１４：２２５４７７３２－２２５４７７５２
ＴＲＡＣ－１５６	ｃｈｒ１４：２２５４７６５６－２２５４７６７６
ＴＲＡＣ－１５７	ｃｈｒ１４：２２５３９０８６－２２５３９１０６
ＴＲＡＣ－１５８	ｃｈｒ１４：２２５４７４９１－２２５４７５１１
ＴＲＡＣ－１５９	ｃｈｒ１４：２２５４７６１８－２２５４７６３８
ＴＲＡＣ－１６０	ｃｈｒ１４：２２５４９６４４－２２５４９６６４
ＴＲＡＣ－１６１	ｃｈｒ１４：２２５４７５２２－２２５４７５４２
ＴＲＡＣ－１６２	ｃｈｒ１４：２２５３９０８９－２２５３９１０９
ＴＲＡＣ－１６３	ｃｈｒ１４：２２５３９０６２－２２５３９０８２
ＴＲＡＣ－１６４	ｃｈｒ１４：２２５４７５９７－２２５４７６１７
ＴＲＡＣ－１６５	ｃｈｒ１４：２２５４７６７７－２２５４７６９７
ＴＲＡＣ－１６６	ｃｈｒ１４：２２５４９６４５－２２５４９６６５
ＴＲＡＣ－１６７	ｃｈｒ１４：２２５５０６１０－２２５５０６３０
ＴＲＡＣ－１６８	ｃｈｒ１４：２２５４７５１１－２２５４７５３１
ＴＲＡＣ－１６９	ｃｈｒ１４：２２５５０６０７－２２５５０６２７

【表２０－４】

TRAC番号：	ゲノム座標　（ｈｇ３８）
ＴＲＡＣ－１７０	ｃｈｒ１４：２２５５０６５７－２２５５０６７７
ＴＲＡＣ－１７１	ｃｈｒ１４：２２５５０６０４－２２５５０６２４
ＴＲＡＣ－１７２	ｃｈｒ１４：２２５３９１３２－２２５３９１５２
ＴＲＡＣ－１７３	ｃｈｒ１４：２２５５０６３２－２２５５０６５２
ＴＲＡＣ－１７４	ｃｈｒ１４：２２５４７５７１－２２５４７５９１
ＴＲＡＣ－１７５	ｃｈｒ１４：２２５４７７１１－２２５４７７３１
ＴＲＡＣ－１７６	ｃｈｒ１４：２２５４７６６６－２２５４７６８６
ＴＲＡＣ－１７７	ｃｈｒ１４：２２５４７５６７－２２５４７５８７
ＴＲＡＣ－１７８	ｃｈｒ１４：２２５４７６２４－２２５４７６４４
ＴＲＡＣ－１８５	ｃｈｒ１４：２２５４７５０１－２２５４７５２１
ＴＲＡＣ－２１３	ｃｈｒ１４：２２５４７５１９－２２５４７５３９
ＴＲＡＣ－２１４	ｃｈｒ１４：２２５４７５５６－２２５４７５７６
ＴＲＡＣ－２１５	ｃｈｒ１４：２２５４７４８６－２２５４７５０６
ＴＲＡＣ－２１６	ｃｈｒ１４：２２５４７４８７－２２５４７５０７
ＴＲＡＣ－２１７	ｃｈｒ１４：２２５４７４９３－２２５４７５１３
ＴＲＡＣ－２１８	ｃｈｒ１４：２２５４７５０２－２２５４７５２２

から選択されるゲノム座標内にＴＲＡＣの遺伝子修飾を含む、または、当該遺伝子修飾が、ｃｈｒ１４：２２５４７５２４－２２５４７５４４、ｃｈｒ１４：２２５４７５２９－２２５４７５４９、ｃｈｒ１４：２２５４７５２５－２２５４７５４５、ｃｈｒ１４：２２５４７５３６－２２５４７５５６、ｃｈｒ１４：２２５４７５０１－２２５４７５２１、ｃｈｒ１４：２２５４７５５６－２２５４７５７６、及びｃｈｒ１４：２２５４７５０２－２２５４７５２２から選択されるゲノム座標内にある、実施形態６に記載の操作された細胞である。

【０２４１】

実施形態９は、当該細胞が、遺伝子修飾を含み、当該遺伝子修飾が、１つ以上のＭＨＣクラスＩタンパク質の発現を阻害する、実施形態１～８のいずれか１つに記載の操作された細胞である。

【０２４２】

実施形態１０は、１つ以上のＭＨＣクラスＩタンパク質の発現を阻害する当該遺伝子修飾が、Ｂ２Ｍ配列における遺伝子修飾であり、当該遺伝子修飾が、以下：

【表２１－１】

ゲノム位置 (hg38)	ガイド配列	配列番号	B2M－番号
chr15:44711469-44711494	UGGCUGGGCA CGCGUUUAAU AUAAG		B2M-1
chr15:44711472-44711497	CUGGGCACGC GUUUAAUAUA AGUGG	115	B2M-2
chr15:44711483-4471 1508	UUUAAUAUAA GUGGAGGCGU CGCGC	116	B2M-3
chr15:44711486-44711511	AAUAUAAGUG GAGGCGUCGC GCUGG	117	B2M-4
chr15:44711487-44711512	AUAUAAGUGG AGGCGUCGCG CUGGC	118	B2M-5
chr15:44711512-44711537	GGGCAUUCCU GAAGCUGACA GCAUU	119	B2M-6
chr15:44711513-44711538	GGCAUUCCUG AAGCUGACAG CAUUC	120	B2M-7
chr15:44711534-44711559	AUUCGGGCCG AGAUGUCUCG CUCCG	121	B2M-8
chr15:44711568-44711593	CUGUGCUCGC GCUACUCUCU CUUUC	122	B2M-9
chr15:44711573-44711598	CUCGCGCUAC UCUCUCUUUC UGGCC	123	B2M-10
chr15:44711576-44711601	GCGCUACUCU CUCUUUCUGG CCUGG	124	B2M-11
chr15:44711466-44711491	AUAUUAAACG CGUGCCCAGC CAAUC	125	B2M-12
chr15:44711522-44711547	UCUCGGCCCG AAUGCUGUCA GCUUC	126	B2M-13
chr15:44711544-44711569	GCUAAGGCCA CGGAGCGAGA CAUCU	127	B2M-14
chr15:44711559-44711584	AGUAGCGCGA GCACAGCUAA GGCCA	128	B2M-15
chr15:44711565-44711590	AGAGAGAGUA GCGCGAGCAC AGCUA	129	B2M-16
chr15:44711599-44711624	GAGAGACUCA CGCUGGAUAG CCUCC	130	B2M-17
chr15:44711611-44711636	GCGGGAGGGU AGGAGAGACU CACGC	131	B2M-18

【表２１－２】

ゲノム位置 (hg38)	ガイド配列	配列番号	B2M－番号
chr15:44715412-44715437	UAUUCCUCAG GUACUCCAAA GAUUC	132	B2M-19
chr15:44715440-44715465	UUUACUCACG UCAUCCAGCA GAGAA	133	B2M-20
chr15:44715473-44715498	CAAAUUUCCU GAAUUGCUAU GUGUC	134	B2M-21
chr15:44715474-44715499	AAAUUUCCUG AAUUGCUAUG UGUCU	135	B2M-22
chr15:44715515-44715540	ACAUUGAAGU UGACUUACUG AAGAA	136	B2M-23
chr15:44715535-44715560	AAGAAUGGAG AGAGAAUUGA AAAAG	137	B2M-24
chr15:44715562-44715587	GAGCAUUCAG ACUUGUCUUU CAGCA	138	B2M-25
chr15:44715567-44715592	UUCAGACUUG UCUUUCAGCA AGGAC	139	B2M-26
chr15:44715672-44715697	UUUGUCACAG CCCAAGAUAG UUAAG	140	B2M-27
chr15:44715673-44715698	UUGUCACAGC CCAAGAUAGU UAAGU	141	B2M-28
chr15:44715674-44715699	UGUCACAGCC CAAGAUAGUU AAGUG	142	B2M-29
chr15:44715410-44715435	AUCUUUGGAG UACCUGAGGA AUAUC	143	B2M-30
chr15:44715411-44715436	AAUCUUUGGA GUACCUGAGG AAUAU	144	B2M-31
chr15:44715419-44715444	UAAACCUGAA UCUUUGGAGU ACCUG	145	B2M-32
chr15:44715430-44715455	GAUGACGUGA GUAAACCUGA AUCUU	146	B2M-33
chr15:44715457-44715482	GGAAAUUUGA CUUUCCAUUC UCUGC	147	B2M-34
chr15:44715483-44715508	AUGAAACCCA GACACAUAGC AAUUC	148	B2M-35
chr15:44715511-44715536	UCAGUAAGUC AACUUCAAUG UCGGA	149	B2M-36

【表２１－３】

ゲノム位置 (hg38)	ガイド配列	配列番号	B2M－番号
chr15:44715515-44715540	UUCUUCAGUA AGUCAACUUC AAUGU	150	B2M-37
chr15:44715629-44715654	CAGGCAUACU CAUCUUUUUC AGUGG	151	B2M-38
chr15:44715630-44715655	GCAGGCAUAC UCAUCUUUUU CAGUG	152	B2M-39
chr15:44715631-44715656	GGCAGGCAUA CUCAUCUUUU UCAGU	153	B2M-40
chr15:4471S632-44715657	CGGCAGGCAU ACUCAUCUUU UUCAG	154	B2M-41
chr15:44715653-44715678	GACAAAGUCA CAUGGUUCAC ACGGC	155	B2M-42
chr15:44715657-44715682	CUGUGACAAA GUCACAUGGU UCACA	156	B2M-43
chr15:44715666-44715691	UAUCUUGGGC UGUGACAAAG UCACA	157	B2M-44
chr15:44715685-44715710	AAGACUUACC CCACUUAACU AUCUU	158	B2M-45
chr15:44715686-44715711	UAAGACUUAC CCCACUUAAC UAUCU	159	B2M-46
chr15:44716326-44716351	AGAUCGAGAC AUGUAAGCAG CAUCA	160	B2M-47
chr15:44716329-44716354	UCGAGACAUG UAAGCAGCAU CAUGG	161	B2M-48
chr15:44716313-44716338	AUGUCUCGAU CUAUGAAAAA GACAG	162	B2M-49
chr15:44717599-44717624	UUUUCAGGUU UGAAGAUGCC GCAUU	163	B2M-50
chr15:44717604-44717629	AGGUUUGAAG AUGCCGCAUU UGGAU	164	B2M-51
chr15:44717681-44717706	CACUUACACU UUAUGCACAA AAUGU	165	B2M-52
chr15:44717682-44717707	ACUUACACUU UAUGCACAAA AUGUA	166	B2M-53
chr15:44717702-44717727	AUGUAGGGUU AUAAUAAUGU UAACA	167	B2M-54

【表２１－４】

ゲノム位置 (hg38)	ガイド配列	配列番号	B2M－番号
chr15:44717764-44717789	GUCUCCAUGU UUGAUGUAUC UGAGC	168	B2M-55
chr15:44717776-44717801	GAUGUAUCUG AGCAGGUUGC UCCAC	169	B2M-56
chr15:44717786-44717811	AGCAGGUUGC UCCACAGGUA GCUCU	170	B2M-57
chr15:44717789-44717814	AGGUUGCUCC ACAGGUAGCU CUAGG	171	B2M-58
chr15:44717790-44717815	GGUUGCUCCA CAGGUAGCUC UAGGA	172	B2M-59
chr15:44717794-44717819	GCUCCACAGG UAGCUCUAGG AGGGC	173	B2M-60
chr15:44717805-44717830	AGCUCUAGGA GGGCUGGCAA CUUAG	174	B2M-61
chr15:44717808-44717833	UCUAGGAGGG CUGGCAACUU AGAGG	175	B2M-62
chr15:44717809-44717834	CUAGGAGGGC UGGCAACUUA GAGGU	176	B2M-63
chr15:44717810-44717835	UAGGAGGGCU GGCAACUUAG AGGUG	177	B2M-64
chr15:44717846-44717871	AUUCUCUUAU CCAACAUCAA CAUCU	178	B2M-65
chr15:44717945-44717970	CAAUUUACAU ACUCUGCUUA GAAUU	179	B2M-66
chr15:44717946-44717971	AAUUUACAUA CUCUGCUUAG AAUUU	180	B2M-67
chr15:44717947-44717972	AUUUACAUAC UCUGCUUAGA AUUUG	181	B2M-68
chr15:44717948-44717973	UUUACAUACU CUGCUUAGAA UUUGG	182	B2M-69
chr15:44717973-44717998	GGGAAAAUUU AGAAAUAUAA UUGAC	183	B2M-70
chr15:44717981-44718006	UUAGAAAUAU AAUUGACAGG AUUAU	184	B2M-71
chr15:44718056-44718081	UACUUCUUAU ACAUUUGAUA AAGUA	185	B2M-72

【表２１－５】

ゲノム位置 (hg38)	ガイド配列	配列番号	B2M－番号
chr15:44718061-44718086	CUUAUACAUU UGAUAAAGUA AGGCA	186	B2M-73
chr15:44718067-44718092	CAUUUGAUAA AGUAAGGCAU GGUUG	187	B2M-74
chr15:44718076-44718101	AAGUAAGGCA UGGUUGUGGU UAAUC	188	B2M-75
chr15:44717589-44717614	CUUCAAACCU GAAAAGAAAA GAAAA	189	B2M-76
chr15:44717620-44717645	AUUUGGAAUU CAUCCAAUCC AAAUG	190	B2M-77
chr15:44717642-44717667	UAUUAAAAAG CAAGCAAGCA GAAUU	191	B2M-78
chr15:44717771-44717796	GCAACCUGCU CAGAUACAUC AAACA	192	B2M-79
chr15:44717800-44717825	UUGCCAGCCC UCCUAGAGCU ACCUG	193	B2M-80
chr15:44717859-44717884	UCAAAUCUGA CCAAGAUGUU GAUGU	194	B2M-81
chr15:44717947-44717972	CAAAUUCUAA GCAGAGUAUG UAAAU	195	B2M-82
chr15:44718119-44718144	CAAGUUUUAU GAUUUAUUUA ACUUG	196	B2M-83

から選択されるゲノム座標内にある、実施形態９に記載の操作された細胞である。

【０２４３】

実施形態１１は、１つ以上のＭＨＣクラスＩタンパク質の発現を阻害する当該遺伝子修飾が、ＨＬＡ－Ａ配列における遺伝子修飾であり、任意選択で、当該遺伝子修飾が、ｃｈｒ６：２９９４２８５４－ｃｈｒ６：２９９４２９１３及びｃｈｒ６：２９９４３５１８－ｃｈｒ６：２９９４３６１９から選択されるゲノム座標、任意選択で、ｃｈｒ６：２９９４２８６４－２９９４２８８４、ｃｈｒ６：２９９４２８６８－２９９４２８８８、ｃｈｒ６：２９９４２８７６－２９９４２８９６、ｃｈｒ６：２９９４２８７７－２９９４２８９７、ｃｈｒ６：２９９４２８８３－２９９４２９０３、ｃｈｒ６：２９９４３１２６－２９９４３１４６、ｃｈｒ６：２９９４３５２８－２９９４３５４８、ｃｈｒ６：２９９４３５２９－２９９４３５４９、ｃｈｒ６：２９９４３５３０－２９９４３５５０、ｃｈｒ６：２９９４３５３７－２９９４３５５７、ｃｈｒ６：２９９４３５４９－２９９４３５６９、ｃｈｒ６：２９９４３５８９－２９９４３６０９、及びｃｈｒ６：２９９４４０２６－２９９４４０４６から選択されるゲノム座標内にある、実施形態９に記載の操作された細胞である。

【０２４４】

実施形態１２は、当該細胞が、遺伝子修飾を含み、当該遺伝子修飾が、１つ以上のＭＨＣクラスＩＩタンパク質の発現を阻害する、前出の実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞である。

【０２４５】

実施形態１３は、１つ以上のＭＨＣクラスＩＩタンパク質の発現を阻害する当該遺伝子

修飾が、ＣＩＩＴＡ配列における遺伝子修飾であり、当該遺伝子修飾が、ｃｈｒ：１６：１０９０２１７１－１０９２３２４２、任意選択で、ｃｈｒ１６：１０９０２６６２－１０９２３２８５、ｃｈｒ１６：１０９０６５４２－１０９２３２８５、またはｃｈｒ１６：１０９０６５４２－１０９０８１２１、任意選択で、ｃｈｒ１６：１０９０８１３２－１０９０８１５２、ｃｈｒ１６：１０９０８１３１－１０９０８１５１、ｃｈｒ１６：１０９１６４５６－１０９１６４７６、ｃｈｒ１６：１０９１８５０４－１０９１８５２４、ｃｈｒ１６：１０９０９０２２－１０９０９０４２、ｃｈｒ１６：１０９１８５１２－１０９１８５３２、ｃｈｒ１６：１０９１８５１１－１０９１８５３１、ｃｈｒ１６：１０８９５７４２－１０８９５７６２、ｃｈｒ１６：１０９１６３６２－１０９１６３８２、ｃｈｒ１６：１０９１６４５５－１０９１６４７５、ｃｈｒ１６：１０９０９１７２－１０９０９１９２、ｃｈｒ１６：１０９０６４９２－１０９０６５１２、ｃｈｒ１６：１０９０９００６－１０９０９０２６、ｃｈｒ１６：１０９２２４７８－１０９２２４９８、ｃｈｒ１６：１０８９５７４７－１０８９５７６７、ｃｈｒ１６：１０９１６３４８－１０９１６３６８、ｃｈｒ１６：１０９１０１８６－１０９１０２０６、ｃｈｒ１６：１０９０６４８１－１０９０６５０１、ｃｈｒ１６：１０９０９００７－１０９０９０２７、ｃｈｒ１６：１０８９５４１０－１０８９５４３０、及びｃｈｒ１６：１０９０８１３０－１０９０８１５０、任意選択で、ｃｈｒ１６：１０９１８５０４－１０９１８５２４、ｃｈｒ１６：１０９２３２１８－１０９２３２３８、ｃｈｒ１６：１０９２３２１９－１０９２３２３９、ｃｈｒ１６：１０９２３２２１－１０９２３２４１、ｃｈｒ１６：１０９０６４８６－１０９０６５０６、ｃｈｒ１６：１０９０６４８５－１０９０６５０５、ｃｈｒ１６：１０９０３８７３－１０９０３８９３、ｃｈｒ１６：１０９０９１７２－１０９０９１９２、ｃｈｒ１６：１０９１８４２３－１０９１８４４３、ｃｈｒ１６：１０９１６３６２－１０９１６３８２、ｃｈｒ１６：１０９１６４５０－１０９１６４７０、ｃｈｒ１６：１０９２２１５３－１０９２２１７３、ｃｈｒ１６：１０９２３２２２－１０９２３２４２、ｃｈｒ１６：１０９１０１７６－１０９１０１９６、ｃｈｒ１６：１０８９５７４２－１０８９５７６２、ｃｈｒ１６：１０９１６４４９－１０９１６４６９、ｃｈｒ１６：１０９２３２１４－１０９２３２３４、ｃｈｒ１６：１０９０６４９２－１０９０６５１２、及びｃｈｒ１６：１０９０６４８７－１０９０６５０、または任意選択で、ｃｈｒ１６：１０９１６４３２－１０９１６４５２、ｃｈｒ１６：１０９２２４４４－１０９２２４６４、ｃｈｒ１６：１０９０７９２４－１０９０７９４４、ｃｈｒ１６：１０９０６９８５－１０９０７００５、ｃｈｒ１６：１０９０８０７３－１０９０８０９３、ｃｈｒ１６：１０９０７４３３－１０９０７４５３、ｃｈｒ１６：１０９０７９７９－１０９０７９９９、ｃｈｒ１６：１０９０７１３９－１０９０７１５９、ｃｈｒ１６：１０９２２４３５－１０９２２４５５、ｃｈｒ１６：１０９０７３８４－１０９０７４０４、ｃｈｒ１６：１０９０７４３４－１０９０７４５４、ｃｈｒ１６：１０９０７１１９－１０９０７１３９、ｃｈｒ１６：１０９０７５３９－１０９０７５５９、ｃｈｒ１６：１０９０７８１０－１０９０７８３０、ｃｈｒ１６：１０９０７３１５－１０９０７３３５、ｃｈｒ１６：１０９１６４２６－１０９１６４４６、ｃｈｒ１６：１０９０９１３８－１０９０９１５８、ｃｈｒ１６：１０９０８１０１－１０９０８１２１、ｃｈｒ１６：１０９０７７９０－１０９０７８１０、ｃｈｒ１６：１０９０７７８７－１０９０７８０７、ｃｈｒ１６：１０９０７４５４－１０９０７４７４、ｃｈｒ１６：１０８９５７０２－１０８９５７２２、ｃｈｒ１６：１０９０２７２９－１０９０２７４９、ｃｈｒ１６：１０９１８４９２－１０９１８５１２、ｃｈｒ１６：１０９０７９３２－１０９０７９５２、ｃｈｒ１６：１０９０７６２３－１０９０７６４３、ｃｈｒ１６：１０９０７４６１－１０９０７４８１、ｃｈｒ１６：１０９０２７２３－１０９０２７４３、ｃｈｒ１６：１０９０７６２２－１０９０７６４２、ｃｈｒ１６：１０９２２４４１－１０９２２４６１、ｃｈｒ１６：１０９０２６６２－１０９０２６８２、ｃｈｒ１６：１０９１５６２６－１０９１５６４６、ｃｈｒ１６：１０９１５５９２－１０９１５６１２、ｃｈｒ１６：１０９０７３８５－１０９０７４０５、ｃｈｒ１６：１０９０７０３０－１０９０７０５０、ｃｈｒ１６：１０９０７９３５－１０９０７９５５、ｃｈｒ１６：１０９０６８５

３－１０９０６８７３、ｃｈｒ１６：１０９０６７５７－１０９０６７７７、ｃｈｒ１６：１０９０７７３０－１０９０７７５０、及びｃｈｒ１６：１０８９５３０２－１０８９５３２２から選択されるゲノム座標内にある、実施形態１２に記載の操作された細胞である。

【０２４６】

実施形態１４は、１つ以上のＭＨＣクラスＩＩタンパク質の発現を阻害する当該遺伝子修飾は、ＣＩＩＴＡスプライス部位の少なくとも１つのヌクレオチドの修飾であり、任意選択で、

ａ）ＣＩＩＴＡスプライスドナー部位の少なくとも１つのヌクレオチドの修飾、及び／または

ｂ）ＣＩＩＴＡスプライス部位境界ヌクレオチドの修飾である、実施形態１２または１３に記載の操作された細胞である。

【０２４７】

実施形態１５は、当該細胞が、ＬＡＧ３タンパク質の細胞表面発現が低減されている、実施形態１～１４のいずれか１つに記載の操作された細胞である。

【０２４８】

実施形態１６は、当該細胞が、ＬＡＧ３タンパク質の細胞表面発現が低減されており、かつ当該細胞では、ＴＲＡＣタンパク質の細胞表面発現が低減している、実施形態１～１５のいずれか１つに記載の操作された細胞である。

【０２４９】

実施形態１７は、当該細胞が、ＴＲＢＣタンパク質の細胞表面発現が低減している、ことをさらに含む、実施形態１５または１６に記載の操作された細胞である。

【０２５０】

実施形態１８は、ＬＡＧ３の当該細胞表面発現が、検出のレベルを下回っている、実施形態１５～１７のいずれか１つに記載の操作された細胞である。

【０２５１】

実施形態１９は、ＴＲＡＣ及びＴＲＢＣの少なくとも１つの細胞表面発現が、検出のレベルを下回っている、実施形態１５～１７のいずれか１つに記載の操作された細胞である。

【０２５２】

実施形態２０は、ＬＡＧ３、ＴＲＡＣ及びＴＲＢＣのそれぞれの細胞表面発現が、検出のレベルを下回っている、実施形態１５～１８のいずれか１つに記載の操作された細胞である。

【０２５３】

実施形態２１は、ｃｈｒ１：５０１６－３７７４３のゲノム座標内に、ヒト２Ｂ４／ＣＤ２４４配列における遺伝子修飾を含む、前出の実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞。

【０２５４】

実施形態２２は、２Ｂ４／ＣＤ２４４における当該遺伝子修飾が、以下：

【表２２】

２Ｂ４番号	ゲノム座標　（ｈｇ３８）
２Ｂ４－１	ｃｈｒ１：１６０８４１６１１－１６０８４１６３１
２Ｂ４－２	ｃｈｒ１：１６０８４１８６５－１６０８４１８８５
２Ｂ４－３	ｃｈｒ１：１６０８６２６２４－１６０８６２６４４
２Ｂ４－４	ｃｈｒ１：１６０８６２６７１－１６０８６２６９１
２Ｂ４－５	ｃｈｒ１：１６０８４１６２２－１６０８４１６４２
２Ｂ４－６	ｃｈｒ１：１６０８４１８１９－１６０８４１８３９
２Ｂ４－７	ｃｈｒ１：１６０８４１８２３－１６０８４１８４３
２Ｂ４－８	ｃｈｒ１：１６０８４１７１７－１６０８４１７３７
２Ｂ４－９	ｃｈｒ１：１６０８４１８５９－１６０８４１８７９
２Ｂ４－１０	ｃｈｒ１：１６０８４１８０６－１６０８４１８２６
２Ｂ４－１１	ｃｈｒ１：１６０８４１８３４－１６０８４１８５４
２Ｂ４－１２	ｃｈｒ１：１６０８４１７８０－１６０８４１８００
２Ｂ４－１３	ｃｈｒ１：１６０８４１７１３－１６０８４１７３３
２Ｂ４－１４	ｃｈｒ１：１６０８４１６３１－１６０８４１６５１
２Ｂ４－１５	ｃｈｒ１：１６０８４１７０４－１６０８４１７２４
２Ｂ４－１６	ｃｈｒ１：１６０８４１５８４－１６０８４１６０４
２Ｂ４－１７	ｃｈｒ１：１６０８４１６７９－１６０８４１６９９
２Ｂ４－１８	ｃｈｒ１：１６０８４１８７４－１６０８４１８９４
２Ｂ４－１９	ｃｈｒ１：１６０８４１７５０－１６０８４１７７０
２Ｂ４－２０	ｃｈｒ１：１６０８４１５７７－１６０８４１５９７
２Ｂ４－２１	ｃｈｒ１：１６０８４１４５９－１６０８４１４７９
２Ｂ４－２２	ｃｈｒ１：１６０８４１４６６－１６０８４１４８６
２Ｂ４－２３	ｃｈｒ１：１６０８４１４６１－１６０８４１４８１
２Ｂ４－２４	ｃｈｒ１：１６０８４１４６０－１６０８４１４８０
２Ｂ４－２５	ｃｈｒ１：１６０８４１３６０－１６０８４１３８０
２Ｂ４－２６	ｃｈｒ１：１６０８４１３０４－１６０８４１３２４
２Ｂ４－２７	ｃｈｒ１：１６０８４１１９５－１６０８４１２１５
２Ｂ４－２８	ｃｈｒ１：１６０８４１３０５－１６０８４１３２５

から選択されるゲノム座標、任意に、２Ｂ４－１～２Ｂ４－５；２Ｂ４－１及び２Ｂ４－２；または２Ｂ４－３、２Ｂ４－４、２Ｂ４－１０、及び２Ｂ４－１７によって標的とされるものから選択されるゲノム座標である、操作された細胞である。

【０２５５】

実施形態２３は、ｃｈｒ５：１５７０８５８３２－１５７１０９０４４のゲノム座標内に、ヒトＴＩＭ３配列における遺伝子修飾を含む、前出の実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞である。

【０２５６】

実施形態２４は、ＴＩＭ３における当該遺伝子修飾が、以下：

【表２３－１】

ＴＩＭ３番号	ゲノム座標（ｈｇ３８）
ＴＩＭ３－１	ｃｈｒ５：１５７１０６８６７－１５７１０６８８７
ＴＩＭ３－２	ｃｈｒ５：１５７１０６８６２－１５７１０６８８２
ＴＩＭ３－３	ｃｈｒ５：１５７１０６８０３－１５７１０６８２３
ＴＩＭ３－４	ｃｈｒ５：１５７１０６８５０－１５７１０６８７０
ＴＩＭ３－５	ｃｈｒ５：１５７１０４７２６－１５７１０４７４６
ＴＩＭ３－６	ｃｈｒ５：１５７１０６６６８－１５７１０６６８８
ＴＩＭ３－７	ｃｈｒ５：１５７１０４６８１－１５７１０４７０１
ＴＩＭ３－８	ｃｈｒ５：１５７１０４６８１－１５７１０４７０１
ＴＩＭ３－９	ｃｈｒ５：１５７１０４６８０－１５７１０４７００
ＴＩＭ３－１０	ｃｈｒ５：１５７１０６６７６－１５７１０６６９６
ＴＩＭ３－１１	ｃｈｒ５：１５７０８７２７１－１５７０８７２９１
ＴＩＭ３－１２	ｃｈｒ５：１５７０９５４３２－１５７０９５４５２
ＴＩＭ３－１３	ｃｈｒ５：１５７０９５３６１－１５７０９５３８１
ＴＩＭ３－１４	ｃｈｒ５：１５７０９５３６０－１５７０９５３８０
ＴＩＭ３－１５	ｃｈｒ５：１５７１０８９４５－１５７１０８９６５
ＴＩＭ３－１８	ｃｈｒ５：１５７１０６７５１－１５７１０６７７１
ＴＩＭ３－１９	ｃｈｒ５：１５７０９５４１９－１５７０９５４３９
ＴＩＭ３－２２	ｃｈｒ５：１５７１０４６７９－１５７１０４６９９
ＴＩＭ３－２３	ｃｈｒ５：１５７１０６８２４－１５７１０６８４４
ＴＩＭ３－２６	ｃｈｒ５：１５７０８７１１７－１５７０８７１３７
ＴＩＭ３－２９	ｃｈｒ５：１５７０９５３７９－１５７０９５３９９
ＴＩＭ３－３２	ｃｈｒ５：１５７１０６８６４－１５７１０６８８４
ＴＩＭ３－４２	ｃｈｒ５：１５７０９５４０５－１５７０９５４２５
ＴＩＭ３－４４	ｃｈｒ５：１５７０９５４０４－１５７０９５４２４
ＴＩＭ３－５６	ｃｈｒ５：１５７１０６８８８－１５７１０６９０８
ＴＩＭ３－５８	ｃｈｒ５：１５７０８７１２６－１５７０８７１４６

【表２３－２】

ＴＩＭ３－５９	ｃｈｒ５：１５７０８７２５３－１５７０８７２７３
ＴＩＭ３－６２	ｃｈｒ５：１５７１０６８８９－１５７１０６９０９
ＴＩＭ３－６３	ｃｈｒ５：１５７１０６９３５－１５７１０６９５５
ＴＩＭ３－６６	ｃｈｒ５：１５７１０６６４１－１５７１０６６６１
ＴＩＭ３－６９	ｃｈｒ５：１５７０８７０８４－１５７０８７１０４
ＴＩＭ３－７５	ｃｈｒ５：１５７１０４６６３－１５７１０４６８３
ＴＩＭ３－８２	ｃｈｒ５：１５７１０６８７５－１５７１０６８９５
ＴＩＭ３－８６	ｃｈｒ５：１５７０８７１８４－１５７０８７２０４
ＴＩＭ３－８７	ｃｈｒ５：１５７１０６９３６－１５７１０６９５６
ＴＩＭ３－８８	ｃｈｒ５：１５７１０４６９６－１５７１０４７１６

から選択されるゲノム座標：または、ＴＩＭ３－１～ＴＩＭ３－４、ＴＩＭ３－６～ＴＩＭ３－１５、ＴＩＭ３－１８、ＴＩＭ３－１９、ＴＩＭ３－２２、ＴＩＭ３－２９、ＴＩＭ３－４２、ＴＩＭ３－４４、ＴＩＭ３－５８、ＴＩＭ３－６２、ＴＩＭ３－６９、ＴＩＭ３－８２、ＴＩＭ３－８６、及びＴＩＭ３－８８；ＴＩＭ３－１～ＴＩＭ３－５、ＴＩＭ３－７、ＴＩＭ３－８、ＴＩＭ３－１２～ＴＩＭ３－１５、ＴＩＭ３－２３、ＴＩＭ３－２６、ＴＩＭ３－３２、ＴＩＭ３－５６、ＴＩＭ３－５９、ＴＩＭ３－６３、ＴＩＭ３－６６、ＴＩＭ３－７５、及びＴＩＭ３－８７；ＴＩＭ３－２、ＴＩＭ３－４、ＴＩＭ３－１５、ＴＩＭ３－２３、ＴＩＭ３－５６、ＴＩＭ３－５９、ＴＩＭ３－６３、ＴＩＭ３－７５、及びＴＩＭ３－８７；ＴＩＭ３－１～ＴＩＭ３－４；ＴＩＭ３－２、ＴＩＭ－４、及びＴＩＭ３－１５；ＴＩＭ３－２、ＴＩＭ－４、ＴＩＭ３－１５、ＴＩＭ３－６３、及びＴＩＭ３－８７；ＴＩＭ３－２及びＴＩＭ３－１５；ＴＩＭ３－６３及びＴＩＭ３－８７；またはＴＩＭ３－１５から選択される、実施形態２３に記載の操作された細胞である。

【０２５７】

実施形態２５は、ｃｈｒ２：２４１８４９８８１－２４１８５８９０８のゲノム座標内に、ヒトＰＤ－１配列における遺伝子修飾を含む、前出の実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞である。

【０２５８】

実施形態２６は、当該遺伝子修飾が、挿入、欠失、及び置換から選択される、実施形態２１～２５のいずれか１つに記載の操作された細胞である。

【０２５９】

実施形態２７は、当該遺伝子修飾が存在する遺伝子の発現を阻害する遺伝子修飾である、実施形態２１～２６のいずれか１つに記載の操作された細胞である。

【０２６０】

実施形態２８は、当該遺伝子修飾がインデルを含む、前出の実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞である。

【０２６１】

実施形態２９は、当該遺伝子修飾が異種コード配列の挿入を含む、前出の実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞である。

【０２６２】

実施形態３０は、当該遺伝子修飾が置換を含む、前出の実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞である。

【０２６３】

実施形態３１は、当該置換が、ＣからＴへの置換またはＡからＧへの置換を含む、実施形態３０に記載の操作された細胞である。

【０２６４】

実施形態３２は、当該遺伝子修飾により、遺伝子修飾前に、全長タンパク質のアミノ酸配列を有する当該全長タンパク質の翻訳を妨げる、当該核酸配列の変化がもたらす、前出の実施形態のいずれかに記載の操作された細胞である。

【０２６５】

実施形態３３は、当該遺伝子修飾により、当該全長タンパク質のコード配列における早期終止コドンをもたらす当該核酸配列に変化を招く、実施形態３０に記載の操作された細胞である。

【０２６６】

実施形態３４は、当該遺伝子修飾により、当該ゲノム遺伝子座からのｐｒｅ－ｍＲＮＡのスプライシングの変化がもたらされる、実施形態３２に記載の操作された細胞である。

【０２６７】

実施形態３５は、当該阻害により、遺伝子修飾を含む遺伝子からのタンパク質表面発現を低減する、前出の実施形態のいずれかに記載の細胞である。

【０２６８】

実施形態３６は、当該阻害により、遺伝子修飾を含む遺伝子によって制御されるタンパク質表面発現を低減する、前出の実施形態のいずれかに記載の細胞である。

【０２６９】

実施形態３７は、当該細胞が、当該操作された細胞の当該表面上で発現される標的化受容体をコードする外因性核酸を含む、前出の実施形態のいずれかに記載の操作された細胞である。

【０２７０】

実施形態３８は、当該標的化受容体が、ＣＡＲである、実施形態３７に記載の操作された細胞である。

【０２７１】

実施形態３９は、当該標的化受容体が、ＴＣＲである、実施形態３７に記載の操作された細胞である。

【０２７２】

実施形態４０は、当該標的化受容体が、ＷＴ１　ＴＣＲである、実施形態３９に記載の操作された細胞である。

【０２７３】

実施形態４１は、当該操作された細胞が、免疫細胞である、前出の実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞である。

【０２７４】

実施形態４２は、当該操作された細胞が、単球、マクロファージ、肥満細胞、樹状細胞、または顆粒球である、実施形態４２に記載の操作された細胞である。

【０２７５】

実施形態４３は、当該操作された細胞が、リンパ球である、実施形態４１に記載の操作された細胞である。

【０２７６】

実施形態４４は、当該操作された細胞が、Ｔ細胞である、実施形態４３に記載の操作された細胞である。

【０２７７】

実施形態４５は、実施形態１～４４のいずれか１つに記載の操作された細胞を含む、薬学的組成物である。

【０２７８】

実施形態４６は、実施形態１～４４のいずれか１つに記載の操作された細胞を含む、細胞集団である。

【０２７９】
実施形態４７は、細胞の集団を含む薬学的組成物であって、当該細胞集団は、実施形態１～４４のいずれか１つに記載の操作された細胞を含む。
【０２８０】
実施形態４８は、先行実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞、細胞集団、または薬学的組成物を必要とする対象に投与する方法である。
【０２８１】
実施形態４９は、先行実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞、細胞集団、または薬学的組成物を、養子細胞移植（ＡＣＴ）療法として対象に投与する方法である。
【０２８２】
実施形態５０は、ＡＣＴ療法として使用するための前出の実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞、細胞集団、または薬学的組成物である。
【０２８３】
実施形態５１は：
ａ．配列番号１～１７、２４、２６、４１、５９、及び８３から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列、
ｂ．配列番号１～１７、２４、２６、４１、５９、及び８３の配列から選択されるヌクレオチド配列の少なくとも１７、１８、１９、または２０個の連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むガイド配列、
ｃ．配列番号１～１７、２４、２６、４１、５９、及び８３から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも９５％同一または少なくとも９０％同一のヌクレオチド配列を含むガイド配列、
ｄ．配列番号１～１５から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列、
ｅ．配列番号１～１１から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列、
ｆ．配列番号１～４から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列；及び、
ｇ．配列番号１、４、５及び９から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列、
から選択されるヌクレオチド配列を含むＬＡＧ３配列に特異的にハイブリダイズする、ＬＡＧ３ガイドＲＮＡである。
【０２８４】
実施形態５２は、配列番号１～１７、２４、２６、４１、５９、及び８３によって標的とされるものから選択されるゲノム座標内、任意選択で、配列番号１～１５によって標的とされるゲノム座標内、任意選択で、配列番号１～１１によって標的とされるゲノム座標内、任意選択で、配列番号１～４によって標的とされるゲノム座標内、または、任意選択で、配列番号１、４、５、または９によって標的とされるゲノム座標から選択される、染色体位置に指向させるガイド配列を含むＬＡＧ３ガイドＲＮＡ配列である。
【０２８５】
実施形態５３は、当該ガイドＲＮＡが、二重ガイドＲＮＡ（ｄｇＲＮＡ）である、実施形態５１または５２に記載のガイドＲＮＡ。
【０２８６】
実施形態５４は、当該ガイドＲＮＡが、単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である、実施形態５１または５２に記載のガイドＲＮＡ。
【０２８７】
実施形態５５は、当該ガイド配列に対して３’に配列番号４００のヌクレオチド配列をさらに含み、当該ガイドＲＮＡが、５’末端修飾または３’末端修飾を含む、実施形態５４に記載のガイドＲＮＡ。
【０２８８】
実施形態５６は、
５’末端修飾または３’末端修飾、及びｇＲＮＡの保存部分をさらに含み、当該保存部分が、
Ａ．配列番号４００に対して、短縮されたヘアピン１領域、または置換されかつ任意選

択で短縮されたヘアピン１領域であって、
１．以下のヌクレオチド対：Ｈ１－１及びＨ１－１２、Ｈ１－２及びＨ１－１１、Ｈ１－３及びＨ１－１０、またはＨ１－４及びＨ１－９のうちの少なくとも１つが、当該置換されかつ任意選択で短縮されたヘアピン１においてワトソン－クリック対形成ヌクレオチドで置換されており、当該ヘアピン１領域が、任意選択で、
ａ．Ｈ１－５～Ｈ１－８のうちのいずれか１つもしくは２つ、
ｂ．以下のヌクレオチド対：Ｈ１－１及びＨ１－１２、Ｈ１－２及びＨ１－１１、Ｈ１－３及びＨ１－１０、ならびにＨ１－４及びＨ１－９のうちの１つ、２つ、もしくは３つ、または
ｃ．ヘアピン１領域の１～８個のヌクレオチドを欠いているか、あるいは
２．当該短縮されたヘアピン１領域が、４～８個のヌクレオチド、好ましくは４～６個のヌクレオチドを欠いており、
ａ．位置Ｈ１－１、Ｈ１－２、もしくはＨ１－３のうちの１つ以上が、配列番号４００に対して欠失もしくは置換されているか、または
ｂ．位置Ｈ１－６～Ｈ１－１０のうちの１つ以上が、配列番号４００に対して置換されているか、または
３．当該短縮されたヘアピン１領域が、５～１０個のヌクレオチド、好ましくは５～６個のヌクレオチドを欠いており、位置Ｎ１８、Ｈ１－１２、もしくはｎのうちの１つ以上が、配列番号４００に対して置換されている、当該ヘアピン１領域、あるいは
Ｂ．短縮された上部ステム領域であって、当該短縮された上部ステム領域が、１～６個のヌクレオチドを欠いており、当該短縮された上部ステム領域の６、７、８、９、１０、または１１個のヌクレオチドが、配列番号４００に対して４個以下の置換を含む、当該短縮された上部ステム領域、あるいは
Ｃ．ＬＳ６、ＬＳ７、ＵＳ３、ＵＳ１０、Ｂ３、Ｎ７、Ｎ１５、Ｎ１７、Ｈ２－２、及びＨ２－１４のうちのいずれか１つ以上における配列番号４００に対する置換であって、置換基ヌクレオチドが、アデニンが後に続くピリミジンでもなく、ピリミジンが前に存在するアデニンでもない、当該置換、あるいは
Ｄ．上部ステム領域であって、当該上部ステムの修飾が、当該上部ステム領域におけるＵＳ１～ＵＳ１２のうちのいずれか１つ以上の修飾を含む、当該上部ステム領域のうちの１つ以上を含む、実施形態５４に記載のガイドＲＮＡである。

【０２８９】

実施形態５７は、ガイド配列に対して、ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＵＧＣＵＧＵＵＵＵＧ（配列番号２００）３’のヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態５４に記載のガイドＲＮＡである。

【０２９０】

実施形態５８は、ガイド配列に対して、ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ（配列番号２０１）３’のヌクレオチド配列、任意選択で、ガイド配列に対してＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵＵＵＵ（配列番号２０２）３’をさらに含む、実施形態５４に記載のガイドＲＮＡである。

【０２９１】

実施形態５９は、当該ガイドＲＮＡが：ｍＮ＊ｍＮ＊ｍＮ＊ＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＧＵＵＵＵＡＧＡｍＧｍＣｍＵｍＡｍＧｍＡｍＡｍＡｍＵｍＡｍＧｍＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡｍＡｍＣｍＵｍＵｍＧｍＡｍＡｍＡｍＡｍＡｍＡｍＧｍＵｍＧｍＧｍＣｍＡｍＣｍＣｍＧｍＡｍＧｍＵｍＣｍＧｍＧｍＵｍＧｍＣｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵ（配列番号３００）パターンに従って修飾され、「Ｎ」が、任意の天然または非天然のヌクレオチドであってよく、ｍが、２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドであり、＊が、ヌクレオチド残基間のホスホロチオエート連結であり、当該Ｎが、

集合的に任意の先行請求項に記載のガイド配列のヌクレオチド配列であり、任意選択で、各Ｎが、独立して、任意の天然または非天然のヌクレオチドであり、当該ガイド配列が、当該ＬＡＧ３遺伝子に対してＣａｓ９を標的とする、実施形態５７または５８に記載のガイドＲＮＡ。

【０２９２】

実施形態６０は、それぞれのＮが、独立して、あらゆる天然または非天然のヌクレオチドであり、及び、当該ガイド配列は、ＬＡＧ３遺伝子に対するＣａｓ９を標的とする、実施形態５９のガイドＲＮＡである。

【０２９３】

実施形態６１は、当該ガイドＲＮＡが、修飾を含む、実施形態５４～６０のいずれか１つに記載のガイドＲＮＡである。

【０２９４】

実施形態６２は、当該修飾が、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチド、または、２’－Ｆ修飾ヌクレオチドを含む、実施形態６１のガイドＲＮＡである。

【０２９５】

実施形態６３は、当該修飾が、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）結合を含む、実施形態６１～６３のいずれか１つに記載のガイドＲＮＡである。

【０２９６】

実施形態６４は、当該修飾が、当該ガイドＲＮＡが、ｓｇＲＮＡであり、かつ、当該修飾が、当該ガイドＲＮＡの５’末端にある最初の５個のヌクレオチドのうちの１つ以上での修飾を含む、実施形態６１～６３のいずれか１つに記載のガイドＲＮＡである。

【０２９７】

実施形態６５は、当該修飾が、当該ガイドＲＮＡが、ｓｇＲＮＡであり、かつ、当該修飾が、当該ガイドＲＮＡの３’末端にある最後の５個のヌクレオチドのうちの１つ以上での修飾を含む、実施形態６１～６４のいずれか１つに記載のガイドＲＮＡである。

【０２９８】

実施形態６６は、当該修飾が、当該ガイドＲＮＡが、ｓｇＲＮＡであり、かつ、当該修飾が、当該ガイドＲＮＡの最初の４個のヌクレオチドの各々の間のＰＳ結合を含む、実施形態６１～６５のいずれか１つに記載のガイドＲＮＡである。

【０２９９】

実施形態６７は、当該修飾が、当該ガイドＲＮＡが、ｓｇＲＮＡであり、かつ、当該修飾が、当該ガイドＲＮＡの最後の４個のヌクレオチドの各々の間のＰＳ結合を含む、実施形態６１～６６のいずれか１つに記載のガイドＲＮＡである。

【０３００】

実施形態６８は、当該修飾が、当該ガイドＲＮＡが、ｓｇＲＮＡであり、かつ、当該修飾が、当該ガイドＲＮＡの当該５’末端にある最初の３個のヌクレオチドの各々での２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含む、実施形態６１～６６のいずれか１つに記載のガイドＲＮＡである。

【０３０１】

実施形態６９は、当該修飾が、当該ガイドＲＮＡが、ｓｇＲＮＡであり、かつ、当該修飾が、当該ガイドＲＮＡの当該３’末端にある最後の３個のヌクレオチドの各々での２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含む、実施形態６１～６８のいずれか１つに記載のガイドＲＮＡである。

【０３０２】

実施形態７０は、実施形態５３～６９のいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ、及びＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含む組成物であって、当該ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、ポリペプチドＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、またはＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤ポリペプチドをコードする核酸であり、任意選択で、当該ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、Ｃａｓ９ヌクレアーゼである、組成物である。

【０３０３】

実施形態７１は、当該ガイドＤＮＡ結合剤が、ＤＮＡ配列内で修飾を行うことができるポリペプチドである、実施形態７０に記載の組成物である。

【０３０４】

実施形態７２は、当該ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９ヌクレアーゼである、実施形態７１に記載の組成物である。

【０３０５】

実施形態７３は、当該ヌクレアーゼが、クリベース、ニッカーゼ、及び不活性型ヌクレアーゼの群から選択される、実施形態７０～７２のいずれか１つに記載の組成物である。

【０３０６】

実施形態７４は、当該ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸が、

ａ．ＤＮＡコード配列、

ｂ．オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を有するｍＲＮＡ、

ｃ．発現ベクターにおけるコード配列、

ｄ．ウイルスベクターにおけるコード配列から選択される、実施形態７０に記載の組成物である。

【０３０７】

実施形態７５は、以下：

【表２４－１】

ＴＲＡＣ番号：	ゲノム座標　（ｈｇ３８）
ＴＲＡＣ－９０	ｃｈｒ１４：２２５４７５２４－２２５４７５４４
ＴＲＡＣ－９１	ｃｈｒ１４：２２５５０５８１－２２５５０６０１
ＴＲＡＣ－９２	ｃｈｒ１４：２２５５０６０８－２２５５０６２８
ＴＲＡＣ－９３	ｃｈｒ１４：２２５５０６１１－２２５５０６３１
ＴＲＡＣ－９４	ｃｈｒ１４：２２５５０６２２－２２５５０６４２
ＴＲＡＣ－９５	ｃｈｒ１４：２２５４７５２９－２２５４７５４９
ＴＲＡＣ－９６	ｃｈｒ１４：２２５４７５１２－２２５４７５３２
ＴＲＡＣ－９７	ｃｈｒ１４：２２５４７５２５－２２５４７５４５
ＴＲＡＣ－９８	ｃｈｒ１４：２２５４７５３６－２２５４７５５６
ＴＲＡＣ－９９	ｃｈｒ１４：２２５４７５７５－２２５４７５９５
ＴＲＡＣ－１００	ｃｈｒ１４：２２５４７６４０－２２５４７６６０
ＴＲＡＣ－１０１	ｃｈｒ１４：２２５４７６４７－２２５４７６６７
ＴＲＡＣ－１０２	ｃｈｒ１４：２２５４７７７７－２２５４７７９７
ＴＲＡＣ－１０３	ｃｈｒ１４：２２５４９６３８－２２５４９６５８
ＴＲＡＣ－１０４	ｃｈｒ１４：２２５４９６４６－２２５４９６６６
ＴＲＡＣ－１０５	ｃｈｒ１４：２２５５０６００－２２５５０６２０
ＴＲＡＣ－１０６	ｃｈｒ１４：２２５５０６０５－２２５５０６２５
ＴＲＡＣ－１０７	ｃｈｒ１４：２２５５０６２５－２２５５０６４５
ＴＲＡＣ－１０８	ｃｈｒ１４：２２５３９１１６－２２５３９１３６
ＴＲＡＣ－１０９	ｃｈｒ１４：２２５３９１２０－２２５３９１４０
ＴＲＡＣ－１１０	ｃｈｒ１４：２２５４７５１８－２２５４７５３８

【表２４－２】

ＴＲＡＣ番号：	ゲノム座標　（ｈｇ３８）
ＴＲＡＣ－１１１	ｃｈｒ１４：２２５３９０８２－２２５３９１０２
ＴＲＡＣ－１１２	ｃｈｒ１４：２２５３９０６１－２２５３９０８１
ＴＲＡＣ－１１３	ｃｈｒ１４：２２５３９０９７－２２５３９１１７
ＴＲＡＣ－１１４	ｃｈｒ１４：２２５４７６９７－２２５４７７１７
ＴＲＡＣ－１１５	ｃｈｒ１４：２２５５０５７１－２２５５０５９１
ＴＲＡＣ－１１６	ｃｈｒ１４：２２５５０６３１－２２５５０６５１
ＴＲＡＣ－１１７	ｃｈｒ１４：２２５５０６５８－２２５５０６７８
ＴＲＡＣ－１１８	ｃｈｒ１４：２２５４７７１２－２２５４７７３２
ＴＲＡＣ－１１９	ｃｈｒ１４：２２５５０６３６－２２５５０６５６
ＴＲＡＣ－１２０	ｃｈｒ１４：２２５５０６３６－２２５５０６５６
ＴＲＡＣ－１２１	ｃｈｒ１４：２２５５０５８２－２２５５０６０２
ＴＲＡＣ－１２２	ｃｈｒ１４：２２５５０６０６－２２５５０６２６
ＴＲＡＣ－１２３	ｃｈｒ１４：２２５５０６０９－２２５５０６２９
ＴＲＡＣ－１２４	ｃｈｒ１４：２２５４７６９１－２２５４７７１１
ＴＲＡＣ－１２５	ｃｈｒ１４：２２５４７５７６－２２５４７５９６
ＴＲＡＣ－１２６	ｃｈｒ１４：２２５４９６４８－２２５４９６６８
ＴＲＡＣ－１２７	ｃｈｒ１４：２２５４９６６０－２２５４９６８０
ＴＲＡＣ－１２８	ｃｈｒ１４：２２５４７７１６－２２５４７７３６
ＴＲＡＣ－１２９	ｃｈｒ１４：２２５４７５１４－２２５４７５３４
ＴＲＡＣ－１３０	ｃｈｒ１４：２２５５０６６２－２２５５０６８２
ＴＲＡＣ－１３１	ｃｈｒ１４：２２５５０５９３－２２５５０６１３
ＴＲＡＣ－１３２	ｃｈｒ１４：２２５５０６１２－２２５５０６３２
ＴＲＡＣ－１３３	ｃｈｒ１４：２２５４７５２１－２２５４７５４１
ＴＲＡＣ－１３４	ｃｈｒ１４：２２５４７５４０－２２５４７５６０
ＴＲＡＣ－１３５	ｃｈｒ１４：２２５３９１２１－２２５３９１４１
ＴＲＡＣ－１３６	ｃｈｒ１４：２２５４７６３２－２２５４７６５２
ＴＲＡＣ－１３７	ｃｈｒ１４：２２５４７６７４－２２５４７６９４
ＴＲＡＣ－１３８	ｃｈｒ１４：２２５４９６４３－２２５４９６６３
ＴＲＡＣ－１３９	ｃｈｒ１４：２２５４７６５５－２２５４７６７５
ＴＲＡＣ－１４０	ｃｈｒ１４：２２５４７６６７－２２５４７６８７
ＴＲＡＣ－１４１	ｃｈｒ１４：２２５３９０８５－２２５３９１０５
ＴＲＡＣ－１４２	ｃｈｒ１４：２２５４９６３４－２２５４９６５４
ＴＲＡＣ－１４３	ｃｈｒ１４：２２５３９０６４－２２５３９０８４
ＴＲＡＣ－１４４	ｃｈｒ１４：２２５４７６３９－２２５４７６５９
ＴＲＡＣ－１４５	ｃｈｒ１４：２２５４７７３１－２２５４７７５１
ＴＲＡＣ－１４６	ｃｈｒ１４：２２５４７７３４－２２５４７７５４

【表２４－３】

TRAC番号：	ゲノム座標　（ｈｇ３８）
ＴＲＡＣ－１４７	ｃｈｒ１４：２２５４７５９１－２２５４７６１１
ＴＲＡＣ－１４８	ｃｈｒ１４：２２５４７６５７－２２５４７６７７
ＴＲＡＣ－１４９	ｃｈｒ１４：２２５４７５１９－２２５４７５３９
ＴＲＡＣ－１５０	ｃｈｒ１４：２２５４９６７４－２２５４９６９４
ＴＲＡＣ－１５１	ｃｈｒ１４：２２５４７６７８－２２５４７６９８
ＴＲＡＣ－１５２	ｃｈｒ１４：２２５３９０８７－２２５３９１０７
ＴＲＡＣ－１５３	ｃｈｒ１４：２２５４７５９５－２２５４７６１５
ＴＲＡＣ－１５４	ｃｈｒ１４：２２５４７６３３－２２５４７６５３
ＴＲＡＣ－１５５	ｃｈｒ１４：２２５４７７３２－２２５４７７５２
ＴＲＡＣ－１５６	ｃｈｒ１４：２２５４７６５６－２２５４７６７６
ＴＲＡＣ－１５７	ｃｈｒ１４：２２５３９０８６－２２５３９１０６
ＴＲＡＣ－１５８	ｃｈｒ１４：２２５４７４９１－２２５４７５１１
ＴＲＡＣ－１５９	ｃｈｒ１４：２２５４７６１８－２２５４７６３８
ＴＲＡＣ－１６０	ｃｈｒ１４：２２５４９６４４－２２５４９６６４
ＴＲＡＣ－１６１	ｃｈｒ１４：２２５４７５２２－２２５４７５４２
ＴＲＡＣ－１６２	ｃｈｒ１４：２２５３９０８９－２２５３９１０９
ＴＲＡＣ－１６３	ｃｈｒ１４：２２５３９０６２－２２５３９０８２
ＴＲＡＣ－１６４	ｃｈｒ１４：２２５４７５９７－２２５４７６１７
ＴＲＡＣ－１６５	ｃｈｒ１４：２２５４７６７７－２２５４７６９７
ＴＲＡＣ－１６６	ｃｈｒ１４：２２５４９６４５－２２５４９６６５
ＴＲＡＣ－１６７	ｃｈｒ１４：２２５５０６１０－２２５５０６３０
ＴＲＡＣ－１６８	ｃｈｒ１４：２２５４７５１１－２２５４７５３１
ＴＲＡＣ－１６９	ｃｈｒ１４：２２５５０６０７－２２５５０６２７
ＴＲＡＣ－１７０	ｃｈｒ１４：２２５５０６５７－２２５５０６７７
ＴＲＡＣ－１７１	ｃｈｒ１４：２２５５０６０４－２２５５０６２４
ＴＲＡＣ－１７２	ｃｈｒ１４：２２５３９１３２－２２５３９１５２
ＴＲＡＣ－１７３	ｃｈｒ１４：２２５５０６３２－２２５５０６５２
ＴＲＡＣ－１７４	ｃｈｒ１４：２２５４７５７１－２２５４７５９１
ＴＲＡＣ－１７５	ｃｈｒ１４：２２５４７７１１－２２５４７７３１
ＴＲＡＣ－１７６	ｃｈｒ１４：２２５４７６６６－２２５４７６８６
ＴＲＡＣ－１７７	ｃｈｒ１４：２２５４７５６７－２２５４７５８７
ＴＲＡＣ－１７８	ｃｈｒ１４：２２５４７６２４－２２５４７６４４
ＴＲＡＣ－１８５	ｃｈｒ１４：２２５４７５０１－２２５４７５２１
ＴＲＡＣ－２１３	ｃｈｒ１４：２２５４７５１９－２２５４７５３９
ＴＲＡＣ－２１４	ｃｈｒ１４：２２５４７５５６－２２５４７５７６
ＴＲＡＣ－２１５	ｃｈｒ１４：２２５４７４８６－２２５４７５０６
ＴＲＡＣ－２１６	ｃｈｒ１４：２２５４７４８７－２２５４７５０７
ＴＲＡＣ－２１７	ｃｈｒ１４：２２５４７４９３－２２５４７５１３
ＴＲＡＣ－２１８	ｃｈｒ１４：２２５４７５０２－２２５４７５２２

から選択されるゲノム座標に特異的にハイブリダイズするガイドＲＮＡをさらに含み、または任意選択的に、当該遺伝子修飾が、ｃｈｒ１４：２２５４７５２４－２２５４７５４４、ｃｈｒ１４：２２５４７５２９－２２５４７５４９、ｃｈｒ１４：２２５４７５２５－２２５４７５４５、ｃｈｒ１４：２２５４７５３６－２２５４７５５６、ｃｈｒ１４：２２５４７５０１－２２５４７５２１、ｃｈｒ１４：２２５４７５５６－２２５４７５７６、及びｃｈｒ１４：２２５４７５０２－２２５４７５２２から選択されるゲノム座標内にある、実施形態７０～７４のいずれか１つに記載の操作された細胞である。

【０３０８】

実施形態７６は、以下：

【表２５－１】

ＴＲＢＣ番号：	ゲノム座標　（ｈｇ３８）
ＴＲＢＣ－１	ｃｈｒ７：１４２７９１９９６－１４２７９２０１６
ＴＲＢＣ－２	ｃｈｒ７：１４２７９２０４７－１４２７９２０６７
ＴＲＢＣ－３	ｃｈｒ７：１４２７９２００８－１４２７９２０２８
ＴＲＢＣ－４	ｃｈｒ７：１４２７９１９３１－１４２７９１９５１
ＴＲＢＣ－５	ｃｈｒ７：１４２７９１９３０－１４２７９１９５０
ＴＲＢＣ－６	ｃｈｒ７：１４２７９１７４８－１４２７９１７６８
ＴＲＢＣ－７	ｃｈｒ７：１４２７９１７２０－１４２７９１７４０
ＴＲＢＣ－８	ｃｈｒ７：１４２７９２０４１－１４２７９２０６１
ＴＲＢＣ－９	ｃｈｒ７：１４２８０２１１４－１４２８０２１３４
ＴＲＢＣ－１０	ｃｈｒ７：１４２７９２００９－１４２７９２０２９
ＴＲＢＣ－１１	ｃｈｒ７：１４２７９２６９７－１４２７９２７１７
ＴＲＢＣ－１２	ｃｈｒ７：１４２７９１９６３－１４２７９１９８３
ＴＲＢＣ－１３	ｃｈｒ７：１４２７９１９７６－１４２７９１９９６
ＴＲＢＣ－１４	ｃｈｒ７：１４２７９１９７４－１４２７９１９９４
ＴＲＢＣ－１５	ｃｈｒ７：１４２７９１９７０－１４２７９１９９０
ＴＲＢＣ－１６	ｃｈｒ７：１４２７９１９４８－１４２７９１９６８
ＴＲＢＣ－１７	ｃｈｒ７：１４２７９１９１３－１４２７９１９３３
ＴＲＢＣ－１８	ｃｈｒ７：１４２７９１９６１－１４２７９１９８１
ＴＲＢＣ－１９	ｃｈｒ７：１４２７９２０６８－１４２７９２０８８

【表２５－２】

ＴＲＢＣ番号：	ゲノム座標　（ｈｇ３８）
ＴＲＢＣ－２０	ｃｈｒ７：１４２７９１９７５－１４２７９１９９５
ＴＲＢＣ－２１	ｃｈｒ７：１４２７９１７７３－１４２７９１７９３
ＴＲＢＣ－２２	ｃｈｒ７：１４２７９１９１９－１４２７９１９３９
ＴＲＢＣ－２３	ｃｈｒ７：１４２７９１８３４－１４２７９１８５４
ＴＲＢＣ－２４	ｃｈｒ７：１４２７９１８７８－１４２７９１８９８
ＴＲＢＣ－２５	ｃｈｒ７：１４２８０２１４１－１４２８０２１６１
ＴＲＢＣ－２６	ｃｈｒ７：１４２７９１８４４－１４２７９１８６４
ＴＲＢＣ－２７	ｃｈｒ７：１４２８０１１５４－１４２８０１１７４
ＴＲＢＣ－２８	ｃｈｒ７：１４２７９１９６１－１４２７９１９８１
ＴＲＢＣ－２９	ｃｈｒ７：１４２７９２００１－１４２７９２０２１
ＴＲＢＣ－３０	ｃｈｒ７：１４２７９１９７９－１４２７９１９９９
ＴＲＢＣ－３１	ｃｈｒ７：１４２７９２０４１－１４２７９２０６１
ＴＲＢＣ－３２	ｃｈｒ７：１４２７９２００３－１４２７９２０２３
ＴＲＢＣ－３３	ｃｈｒ７：１４２７９１９８４－１４２７９２００４
ＴＲＢＣ－３４	ｃｈｒ７：１４２７９２００２－１４２７９２０２２
ＴＲＢＣ－３５	ｃｈｒ７：１４２７９１９６６－１４２７９１９８６
ＴＲＢＣ－３６	ｃｈｒ７：１４２７９２００７－１４２７９２０２７
ＴＲＢＣ－３７	ｃｈｒ７：１４２７９１９９３－１４２７９２０１３
ＴＲＢＣ－３８	ｃｈｒ７：１４２７９１９０２－１４２７９１９２２
ＴＲＢＣ－３９	ｃｈｒ７：１４２７９１７２４－１４２７９１７４４
ＴＲＢＣ－４０	ｃｈｒ７：１４２７９１９７３－１４２７９１９９３
ＴＲＢＣ－４１	ｃｈｒ７：１４２７９１９２０－１４２７９１９４０
ＴＲＢＣ－４２	ｃｈｒ７：１４２７９１９９４－１４２７９２０１４
ＴＲＢＣ－４３	ｃｈｒ７：１４２７９１８８７－１４２７９１９０７
ＴＲＢＣ－４４	ｃｈｒ７：１４２７９１９０７－１４２７９１９２７
ＴＲＢＣ－４５	ｃｈｒ７：１４２７９１９５２－１４２７９１９７２
ＴＲＢＣ－４６	ｃｈｒ７：１４２７９１７２１－１４２７９１７４１
ＴＲＢＣ－４７	ｃｈｒ７：１４２７９２７１８－１４２７９２７３８
ＴＲＢＣ－４８	ｃｈｒ７：１４２７９１７２９－１４２７９１７４９
ＴＲＢＣ－４９	ｃｈｒ７：１４２７９１９１１－１４２７９１９３１
ＴＲＢＣ－５０	ｃｈｒ７：１４２７９１８６７－１４２７９１８８７
ＴＲＢＣ－５１	ｃｈｒ７：１４２７９１８９９－１４２７９１９１９
ＴＲＢＣ－５２	ｃｈｒ７：１４２７９１７２７－１４２７９１７４７
ＴＲＢＣ－５３	ｃｈｒ７：１４２７９１９４９－１４２７９１９６９
ＴＲＢＣ－５４	ｃｈｒ７：１４２７９１９３３－１４２７９１９５３
ＴＲＢＣ－５５	ｃｈｒ７：１４２７９１９３２－１４２７９１９５２

【表２５－３】

ＴＲＢＣ番号：	ゲノム座標　（ｈｇ３８）
ＴＲＢＣ－５６	ｃｈｒ７：１４２７９２０５７－１４２７９２０７７
ＴＲＢＣ－５７	ｃｈｒ７：１４２７９１９４０－１４２７９１９６０
ＴＲＢＣ－５８	ｃｈｒ７：１４２７９１７４７－１４２７９１７６７
ＴＲＢＣ－５９	ｃｈｒ７：１４２７９１８８１－１４２７９１９０１
ＴＲＢＣ－６０	ｃｈｒ７：１４２７９１７７９－１４２７９１７９９
ＴＲＢＣ－６１	ｃｈｒ７：１４２７９２０５４－１４２７９２０７４
ＴＲＢＣ－６２	ｃｈｒ７：１４２７９２０６９－１４２７９２０８９
ＴＲＢＣ－６３	ｃｈｒ７：１４２７９２７１２－１４２７９２７３２
ＴＲＢＣ－６４	ｃｈｒ７：１４２７９１７２９－１４２７９１７４９
ＴＲＢＣ－６５	ｃｈｒ７：１４２７９１８２１－１４２７９１８４１
ＴＲＢＣ－６６	ｃｈｒ７：１４２７９２０５２－１４２７９２０７２
ＴＲＢＣ－６７	ｃｈｒ７：１４２７９１９１６－１４２７９１９３６
ＴＲＢＣ－６８	ｃｈｒ７：１４２７９１８９９－１４２７９１９１９
ＴＲＢＣ－６９	ｃｈｒ７：１４２７９１７７２－１４２７９１７９２
ＴＲＢＣ－７０	ｃｈｒ７：１４２７９２７１４－１４２７９２７３４
ＴＲＢＣ－７１	ｃｈｒ７：１４２７９２０４２－１４２７９２０６２
ＴＲＢＣ－７２	ｃｈｒ７：１４２７９１９６２－１４２７９１９８２
ＴＲＢＣ－７３	ｃｈｒ７：１４２７９１９８８－１４２７９２００８
ＴＲＢＣ－７４	ｃｈｒ７：１４２７９１９８２－１４２７９２００２
ＴＲＢＣ－７５	ｃｈｒ７：１４２７９２０４９－１４２７９２０６９
ＴＲＢＣ－７６	ｃｈｒ７：１４２７９１８３９－１４２７９１８５９
ＴＲＢＣ－７７	ｃｈｒ７：１４２７９１８９３－１４２７９１９１３
ＴＲＢＣ－７８	ｃｈｒ７：１４２７９１９４５－１４２７９１９６５
ＴＲＢＣ－７９	ｃｈｒ７：１４２７９１９６４－１４２７９１９８４
ＴＲＢＣ－８０	ｃｈｒ７：１４２７９１７５７－１４２７９１７７７
ＴＲＢＣ－８１	ｃｈｒ７：１４２７９２０４８－１４２７９２０６８
ＴＲＢＣ－８２	ｃｈｒ７：１４２７９１７７４－１４２７９１７９４
ＴＲＢＣ－８３	ｃｈｒ７：１４２７９２０４８－１４２７９２０６８
ＴＲＢＣ－８４	ｃｈｒ７：１４２７９１８３０－１４２７９１８５０
ＴＲＢＣ－８５	ｃｈｒ７：１４２７９１９０９－１４２７９１９２９
ＴＲＢＣ－８６	ｃｈｒ７：１４２７９１９１２－１４２７９１９３２
ＴＲＢＣ－８７	ｃｈｒ７：１４２７９１７６６－１４２７９１７８６
ＴＲＢＣ－８８	ｃｈｒ７：１４２７９１８８０－１４２７９１９００
ＴＲＢＣ－８９	ｃｈｒ７：１４２７９１９１９－１４２７９１９３９

から選択されるゲノム座標に特異的にハイブリダイズするガイドＲＮＡをさらに含む、実施形態７０～７５のいずれか１つに記載の操作された細胞である。

【０３０９】

実施形態７７は、ｃｈｒ：１６：１０９０２１７１－１０９２３２４２、任意選択で、ｃｈｒ１６：１０９０２６６２－ｃｈｒ１６：１０９２３２８５、ｃｈｒ１６：１０９０６５４２－１０９２３２８５、またはｃｈｒ１６：１０９０６５４２－１０９０８１２１、任意選択で、ｃｈｒ１６：１０９０８１３２－１０９０８１５２、ｃｈｒ１６：１０９０８１３１－１０９０８１５１、ｃｈｒ１６：１０９１６４５６－１０９１６４７６、ｃｈｒ１６：１０９１８５０４－１０９１８５２４、ｃｈｒ１６：１０９０９０２２－１０９０９０４２、ｃｈｒ１６：１０９１８５１２－１０９１８５３２、ｃｈｒ１６：１０９１８５１１－１０９１８５３１、ｃｈｒ１６：１０８９５７４２－１０８９５７６２、ｃ

ｈｒ１６：１０９１６３６２－１０９１６３８２、ｃｈｒ１６：１０９１６４５５－１０９１６４７５、ｃｈｒ１６：１０９０９１７２－１０９０９１９２、ｃｈｒ１６：１０９０６４９２－１０９０６５１２、ｃｈｒ１６：１０９０９００６－１０９０９０２６、ｃｈｒ１６：１０９２２４７８－１０９２２４９８、ｃｈｒ１６：１０８９５７４７－１０８９５７６７、ｃｈｒ１６：１０９１６３４８－１０９１６３６８、ｃｈｒ１６：１０９１０１８６－１０９１０２０６、ｃｈｒ１６：１０９０６４８１－１０９０６５０１、ｃｈｒ１６：１０９０９００７－１０９０９０２７、ｃｈｒ１６：１０８９５４１０－１０８９５４３０、及びｃｈｒ１６：１０９０８１３０－１０９０８１５０、任意選択で、ｃｈｒ１６：１０９１８５０４－１０９１８５２４、ｃｈｒ１６：１０９２３２１８－１０９２３２３８、ｃｈｒ１６：１０９２３２１９－１０９２３２３９、ｃｈｒ１６：１０９２３２２１－１０９２３２４１、ｃｈｒ１６：１０９０６４８６－１０９０６５０６、ｃｈｒ１６：１０９０６４８５－１０９０６５０５、ｃｈｒ１６：１０９０３８７３－１０９０３８９３、ｃｈｒ１６：１０９０９１７２－１０９０９１９２、ｃｈｒ１６：１０９１８４２３－１０９１８４４３、ｃｈｒ１６：１０９１６３６２－１０９１６３８２、ｃｈｒ１６：１０９１６４５０－１０９１６４７０、ｃｈｒ１６：１０９２２１５３－１０９２２１７３、ｃｈｒ１６：１０９２３２２２－１０９２３２４２、ｃｈｒ１６：１０９１０１７６－１０９１０１９６、ｃｈｒ１６：１０８９５７４２－１０８９５７６２、ｃｈｒ１６：１０９１６４４９－１０９１６４６９、ｃｈｒ１６：１０９２３２１４－１０９２３２３４、ｃｈｒ１６：１０９０６４９２－１０９０６５１２、及びｃｈｒ１６：１０９０６４８７－１０９０６５０、または任意選択で、ｃｈｒ１６：１０９１６４３２－１０９１６４５２、ｃｈｒ１６：１０９２２４４４－１０９２２４６４、ｃｈｒ１６：１０９０７９２４－１０９０７９４４、ｃｈｒ１６：１０９０６９８５－１０９０７００５、ｃｈｒ１６：１０９０８０７３－１０９０８０９３、ｃｈｒ１６：１０９０７４３３－１０９０７４５３、ｃｈｒ１６：１０９０７９７９－１０９０７９９９、ｃｈｒ１６：１０９０７１３９－１０９０７１５９、ｃｈｒ１６：１０９２２４３５－１０９２２４５５、ｃｈｒ１６：１０９０７３８４－１０９０７４０４、ｃｈｒ１６：１０９０７４３４－１０９０７４５４、ｃｈｒ１６：１０９０７１１９－１０９０７１３９、ｃｈｒ１６：１０９０７５３９－１０９０７５５９、ｃｈｒ１６：１０９０７８１０－１０９０７８３０、ｃｈｒ１６：１０９０７３１５－１０９０７３３５、ｃｈｒ１６：１０９１６４２６－１０９１６４４６、ｃｈｒ１６：１０９０９１３８－１０９０９１５８、ｃｈｒ１６：１０９０８１０１－１０９０８１２１、ｃｈｒ１６：１０９０７７９０－１０９０７８１０、ｃｈｒ１６：１０９０７７８７－１０９０７８０７、ｃｈｒ１６：１０９０７４５４－１０９０７４７４、ｃｈｒ１６：１０８９５７０２－１０８９５７２２、ｃｈｒ１６：１０９０２７２９－１０９０２７４９、ｃｈｒ１６：１０９１８４９２－１０９１８５１２、ｃｈｒ１６：１０９０７９３２－１０９０７９５２、ｃｈｒ１６：１０９０７６２３－１０９０７６４３、ｃｈｒ１６：１０９０７４６１－１０９０７４８１、ｃｈｒ１６：１０９０２７２３－１０９０２７４３、ｃｈｒ１６：１０９０７６２２－１０９０７６４２、ｃｈｒ１６：１０９２２４４１－１０９２２４６１、ｃｈｒ１６：１０９０２６６２－１０９０２６８２、ｃｈｒ１６：１０９１５６２６－１０９１５６４６、ｃｈｒ１６：１０９１５５９２－１０９１５６１２、ｃｈｒ１６：１０９０７３８５－１０９０７４０５、ｃｈｒ１６：１０９０７０３０－１０９０７０５０、ｃｈｒ１６：１０９０７９３５－１０９０７９５５、ｃｈｒ１６：１０９０６８５３－１０９０６８７３、ｃｈｒ１６：１０９０６７５７－１０９０６７７７、ｃｈｒ１６：１０９０７７３０－１０９０７７５０、及びｃｈｒ１６：１０８９５３０２－１０８９５３２２から選択されるゲノム座標に特異的にハイブリダイズするガイドＲＮＡをさらに含む、実施形態７０～７６のいずれか１つに記載の組成物である。

【０３１０】

実施形態７８は、ｃｈｒ６：２９９４２８５４－２９９４２９１３及びｃｈｒ６：２９９４３５１８－２９９４３６１９から選択されるゲノム座標、任意選択で、ｃｈｒ６：２９９４２８６４－２９９４２８８４、ｃｈｒ６：２９９４２８６８－２９９４２８８８、

ｃｈｒ６：２９９４２８７６－２９９４２８９６、ｃｈｒ６：２９９４２８７７－２９９４２８９７、ｃｈｒ６：２９９４２８８３－２９９４２９０３、ｃｈｒ６：２９９４３１２６－２９９４３１４６、ｃｈｒ６：２９９４３５２８－２９９４３５４８、ｃｈｒ６：２９９４３５２９－２９９４３５４９、ｃｈｒ６：２９９４３５３０－２９９４３５５０、ｃｈｒ６：２９９４３５３７－２９９４３５５７、ｃｈｒ６：２９９４３５４９－２９９４３５６９、ｃｈｒ６：２９９４３５８９－２９９４３６０９、及びｃｈｒ６：２９９４４０２６－２９９４４０４６から選択されるゲノム座標に特異的にハイブリダイズするガイドＲＮＡをさらに含む、実施形態７０～７７のいずれか１つに記載の組成物である。

【０３１１】

実施形態７９は、実施形態５１～６９のいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ、または実施形態７０～７８のいずれか１つに記載の組成物であり、当該組成物は、薬学的に許容される賦形剤をさらに含む。

【０３１２】

実施形態８０は、当該組成物が、非発熱性である、実施形態７９のガイドＲＮＡまたは組成物である。

【０３１３】

実施形態８１は、実施形態５１～６９のいずれか１つに記載のガイドＲＮＡまたは実施形態７０～８０のいずれか１つに記載の組成物であり、当該ガイドＲＮＡが、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と会合している。

【０３１４】

実施形態８２は、当該細胞を、実施形態５１～８１のいずれか１つに記載のガイドＲＮＡまたは組成物と接触させることを含む、細胞内のＬＡＧ３配列において遺伝子修飾を行う方法である。

【０３１５】

実施形態８３は、ＴＣＲ配列においてＴＣＲ遺伝子の発現を阻害するための遺伝子修飾を行うことをさらに含む、実施形態８２に記載の方法である。

【０３１６】

実施形態８４は、免疫療法のための細胞集団を調製する方法であって、

ａ．ＬＡＧ３ガイドＲＮＡまたは実施形態５１～８３のいずれか１つに記載の組成物を有する集団内の細胞中のＬＡＧ３配列において遺伝子修飾を行うことと、

ｂ．当該集団の当該細胞中のＴＣＲ配列において遺伝子修飾を行い、当該集団内の当該細胞の当該表面上の当該ＴＣＲタンパク質の発現を低減することと、

ｃ．培養物中の当該細胞集団を増殖することと、を含む方法である。

【０３１７】

実施形態８５は、当該細胞の当該表面上の当該ＴＣＲタンパク質の発現が、当該集団内の当該細胞の少なくとも４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、好ましくは少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、または９５％の検出レベル未満に低減される、実施形態８４に記載の方法である。

【０３１８】

実施形態８６は、当該集団の当該細胞におけるＴＣＲ配列の当該遺伝子修飾が、２つ以上のＴＣＲ配列の修飾を含む、実施形態８４または８５に記載の方法である。

【０３１９】

実施形態８７は、２つ以上の当該ＴＣＲ配列が、ＴＲＡＣ及びＴＲＢＣを含む、実施形態８６の方法である。

【０３２０】

実施形態８８は、任意選択で、ＴＲＡＣ遺伝子座で、当該操作された細胞、例えば、ＴＣＲまたはＣＡＲの当該表面上に発現される標的化受容体をコードする外因性核酸の挿入を含む、実施形態８４～８７のいずれかに記載の方法である。

【０３２１】

実施形態８９は、当該細胞を、当該ＬＡＧ３ガイドＲＮＡを含むＬＮＰ組成物と接触さ

せることをさらに含む、実施形態８４～８８のいずれか１つに記載の方法である。
【０３２２】
実施形態９０は、当該細胞を、ガイドＲＮＡを含む第２のＬＮＰ組成物と接触させることを含む、実施形態８９に記載の方法である。
【０３２３】
実施形態９１は、実施形態８２～９０のいずれか１つに記載の方法によって作製される細胞集団である。
【０３２４】
実施形態９２は、当該細胞集団が、エクスビボで改変される、実施形態９１に記載の細胞集団である。
【０３２５】
実施形態９３は、実施形態９１または９２に記載の細胞集団を含む薬学的組成物である。
【０３２６】
実施形態９４は、実施形態９１または９２に記載の細胞の集団、または、実施形態９３に記載の薬学的組成物を必要とする対象に投与する方法である。
【０３２７】
実施形態９５は、実施形態９１または９２に記載の細胞の集団、または、実施形態９３に記載の薬学的組成物を、養子細胞移植（ＡＣＴ）療法として対象に投与する方法である。
【０３２８】
実施形態９６は、ＡＣＴ療法として使用するための、実施形態９０または９１に記載の細胞集団、または実施形態９３に記載の薬学的組成物である。
【０３２９】
実施形態９７は、当該集団内の細胞の少なくとも４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、好ましくは少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、または９５％が、当該内因性ＬＡＧ３配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む、ＬＡＧ３遺伝子の遺伝子修飾を含む細胞集団である。
【０３３０】
実施形態９８は、当該遺伝子修飾が、実施形態１～４のいずれかで定義されるとおりである、実施形態９７に記載の細胞集団である。
【０３３１】
実施形態９９は、ＬＡＧ３の発現が、例えば、当該ＬＡＧ３遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、好ましくは少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、もしくは９５％、またはアッセイの検出限界未満まで減少する、実施形態９７または９８に記載の細胞集団である。
【０３３２】
実施形態１００は、細胞の少なくとも４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、好ましくは少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％が、当該内因性ＴＣＲ遺伝子配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む、ＴＣＲ遺伝子の遺伝子修飾を含む。
【０３３３】
実施形態１０１は、当該遺伝子修飾が、実施形態５～８のいずれかで定義されるとおりである、実施形態１００に記載の細胞集団である。
【０３３４】
実施形態１０２は、ＴＣＲの発現が、例えば、当該ＴＣＲ遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、好ましくは少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、またはアッセイの検出限界未満まで減少する、実施形態１００また

は１０１に記載の細胞集団である。
【０３３５】
実施形態１０３は、当該集団が、少なくとも10^3、10^4、10^5または10^6個の細胞、好ましくは10^7、2×10^7、5×10^7、または10^8個の細胞を含む、実施形態９７～１０２のいずれかに記載の細胞集団である。
【０３３６】
実施形態１０４は、当該集団内の細胞の少なくとも７０％が、当該内因性ＬＡＧ３配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む、実施形態９７～１０３のいずれか１つに記載の細胞集団である。
【０３３７】
実施形態１０５は、当該集団内の細胞の少なくとも８０％が、当該内因性ＬＡＧ３配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む、実施形態９７～１０４のいずれか１つに記載の細胞集団である。
【０３３８】
実施形態１０６は、当該集団内の細胞の少なくとも９０％が、当該内因性ＬＡＧ３配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む、実施形態９７～１０５のいずれか１つに記載の細胞集団である。
【０３３９】
実施形態１０７は、当該集団内の細胞の少なくとも９５％が、当該内因性ＬＡＧ３配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む、実施形態９７～１０６のいずれか１つに記載の細胞集団である。
【０３４０】
実施形態１０８は、ＬＡＧ３の発現が、例えば、当該ＬＡＧ３遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも７０％、またはアッセイの検出限界未満まで減少する、実施形態９７～１０７のいずれか１つに記載の細胞集団である。
【０３４１】
実施形態１０９は、ＬＡＧ３の発現が、例えば、当該ＬＡＧ３遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも８０％、またはアッセイの検出限界未満まで減少する、実施形態９７～１０８のいずれか１つに記載の細胞集団である。
【０３４２】
実施形態１１０は、ＬＡＧ３の発現が、例えば、当該ＬＡＧ３遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも９０％、またはアッセイの検出限界未満まで減少する、実施形態９７～１０９のいずれか１つに記載の細胞集団である。
【０３４３】
実施形態１１１は、ＬＡＧ３の発現が、例えば、当該ＬＡＧ３遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも９５％、またはアッセイの検出限界未満まで減少する、実施形態９７～１１０のいずれか１つに記載の細胞集団である。
【０３４４】
実施形態１１２は、実施形態９７～１１１のいずれか１つに記載の細胞集団を含む、薬学的組成物である。
【０３４５】
実施形態１１３は、ＡＣＴ療法として使用するための、実施形態９７～１１１のいずれかに記載の細胞の集団または実施形態１１２に記載の薬学的組成物である。
【０３４６】
実施形態１１４は、当該遺伝子修飾が、ｃｈｒ１２：６７７３９３８－６７７３９５８のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞、ガイドＲＮＡ、組成物、薬学的組成物、または方法である。
【０３４７】
実施形態１１５は、当該遺伝子修飾が、ｃｈｒ１２：６７７４６７８－６７７４６９８のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞、ガイドＲ

ＮＡ、組成物、薬学的組成物、または方法である。
【０３４８】
実施形態１１６は、当該遺伝子修飾が、ｃｈｒ１２：６７７２８９４－６７７２９１４のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞、ガイドＲＮＡ、組成物、薬学的組成物、または方法である。
【０３４９】
実施形態１１７は、当該遺伝子修飾が、ｃｈｒ１２：６７７４８１６－６７７４８３６のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞、ガイドＲＮＡ、組成物、薬学的組成物、または方法である。
【０３５０】
実施形態１１８は、当該遺伝子修飾が、ｃｈｒ１２：６７７４７４２－６７７４７６２のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞、ガイドＲＮＡ、組成物、薬学的組成物、または方法である。
【０３５１】
実施形態１１９は、当該遺伝子修飾が、ｃｈｒ１２：６７７５３８０－６７７５４００のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞、ガイドＲＮＡ、組成物、薬学的組成物、または方法である。
【０３５２】
実施形態１２０は、当該遺伝子修飾が、ｃｈｒ１２：６７７４７２７－６７７４７４７のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞、ガイドＲＮＡ、組成物、薬学的組成物、または方法である。
【０３５３】
実施形態１２１は、当該遺伝子修飾が、ｃｈｒ１２：６７７４７３２－６７７４７５２のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞、ガイドＲＮＡ、組成物、薬学的組成物、または方法である。
【０３５４】
実施形態１２２は、当該遺伝子修飾が、ｃｈｒ１２：６７７７４３５－６７７７４５５のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞、ガイドＲＮＡ、組成物、薬学的組成物、または方法である。
【０３５５】
実施形態１２３は、当該遺伝子修飾が、ｃｈｒ１２：６７７４７７１－６７７４７９１のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞、ガイドＲＮＡ、組成物、薬学的組成物、または方法である。
【０３５６】
実施形態１２４は、当該遺伝子修飾が、ｃｈｒ１２：６７７２９０９－６７７２９２９のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞、ガイドＲＮＡ、組成物、薬学的組成物、または方法である。
【０３５７】
実施形態１２５は、当該遺伝子修飾が、ｃｈｒ１２：６７７４７３５－６７７４７５５のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞、ガイドＲＮＡ、組成物、薬学的組成物、または方法である。
【０３５８】
実施形態１２６は、当該遺伝子修飾が、ｃｈｒ１２：６７７３７８３－６７７３８０３のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞、ガイドＲＮＡ、組成物、薬学的組成物、または方法である。
【０３５９】
実施形態１２７は、当該遺伝子修飾が、ｃｈｒ１２：６７７５２９２－６７７５３１２のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞、ガイドＲＮＡ、組成物、薬学的組成物、または方法である。
【０３６０】

実施形態１２８は、当該遺伝子修飾が、ｃｈｒ１２：６７７７４３３－６７７７４５３のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞、ガイドＲＮＡ、組成物、薬学的組成物、または方法である。

【０３６１】

実施形態１２９は、当該遺伝子修飾が、ｃｈｒ１２：６７７８２６８－６７７８２８８のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞、ガイドＲＮＡ、組成物、薬学的組成物、または方法である。

【０３６２】

実施形態１３０は、当該遺伝子修飾が、ｃｈｒ１２：６７７５４４４－６７７５４６４のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞、ガイドＲＮＡ、組成物、薬学的組成物、または方法である。

【０３６３】

実施形態１３１は、当該遺伝子修飾が、ｃｈｒ１２：６７７７７８３－６７７７８０３のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞、ガイドＲＮＡ、組成物、薬学的組成物、または方法である。

【０３６４】

実施形態１３２は、当該遺伝子修飾が、ｃｈｒ１２：６７７７７８４－６７７７８０４のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞、ガイドＲＮＡ、組成物、薬学的組成物、または方法である。

【０３６５】

実施形態１３３は、当該遺伝子修飾が、ｃｈｒ１２：６７７８２５２－６７７８２７２のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞、ガイドＲＮＡ、組成物、薬学的組成物、または方法である。

【０３６６】

実施形態１３４は、当該遺伝子修飾が、ｃｈｒ１２：６７７７３２５－６７７７３４５のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞、ガイドＲＮＡ、組成物、薬学的組成物、または方法である。

【０３６７】

実施形態１３５は、当該遺伝子修飾が、ｃｈｒ１２：６７７７３２９－６７７７３４９のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか１つに記載の操作された細胞、ガイドＲＮＡ、組成物、薬学的組成物、または方法である。

【０３６８】

実施形態１３６は、当該遺伝子修飾が、以下：

【表２６】

ＰＤ１番号	ゲノム座標　（ｈｇ３８）
ＰＤ１－２９	ｃｈｒ２：２４１８５２７０３－２４１８５２７２３
ＰＤ１－４３	ｃｈｒ２：２４１８５８８０７－２４１８５８８２７
ＰＤ１－５	ｃｈｒ２：２４１８５８７８９－２４１８５８８０９
ＰＤ１－６	ｃｈｒ２：２４１８５８７８８－２４１８５８８０８
ＰＤ１－８	ｃｈｒ２：２４１８５８７５５－２４１８５８７７５
ＰＤ１－１１	ｃｈｒ２：２４１８５２９１９－２４１８５２９３９
ＰＤ１－１２	ｃｈｒ２：２４１８５２９１５－２４１８５２９３５
ＰＤ１－２２	ｃｈｒ２：２４１８５２７５５－２４１８５２７７５
ＰＤ１－２３	ｃｈｒ２：２４１８５２７５１－２４１８５２７７１
ＰＤ１－２４	ｃｈｒ２：２４１８５２７５０－２４１８５２７７０
ＰＤ１－３６	ｃｈｒ２：２４１８５２２６４－２４１８５２２８４
ＰＤ１－５７	ｃｈｒ２：２４１８５２２０１－２４１８５２２２１
ＰＤ１－５８	ｃｈｒ２：２４１８５２７４９－２４１８５２７６９
ＰＤ１－１７	ｃｈｒ２：２４１８５２８２１－２４１８５２８４１
ＰＤ１－３８	ｃｈｒ２：２４１８５２２６５－２４１８５２２８５
ＰＤ１－５６	ｃｈｒ２：２４１８５１２２１－２４１８５１２４１
ＰＤ１－４１	ｃｈｒ２：２４１８５２１８８－２４１８５２２０８

から選択されるゲノム座標：；または、それぞれ、ｃｈｒ２：２４１８５２９１９－２４１８５　２９３９、ｃｈｒ２：２４１８５２９１５－２４１８５２９３５、ｃｈｒ２：２４１８５２７５０－２４１８５２７７０、ｃｈｒ２：２４１８５２２６４－２４１８５２２８４、ｃｈｒ２：２４１８５２２６５－２４１８５２２８５、ｃｈｒ２：２４１８５８８０７－２４１８５８８２７、ｃｈｒ２：２４１８５２２０１－２４１８５２２２１、ｃｈｒ２：２４１８５８７８９－２４１８５８８０９、ｃｈｒ２：２４１８５８７８８－２４１８５８８０８、ｃｈｒ２：２４１８５８７５５－２４１８５８７７５、ｃｈｒ２：２４１８５２７５５－２４１８５２７７５、ｃｈｒ２：２４１８５２７５１－２４１８５２７７１、及びｃｈｒ２：２４１８５２７０３－２４１８５２７２３から選択されるゲノム座標；または
それぞれ、ｃｈｒ２：２４１８５８７８８－２４１８５８８０８、ｃｈｒ２：２４１８５８７５５－２４１８５８７７５、ｃｈｒ２：２４１８５２９１９－２４１８５２９３９、ｃｈｒ２：２４１８５２９１５－２４１８５２９３５、ｃｈｒ２：２４１８５２７５１－２４１８５２７７１、ｃｈｒ２：２４１８５８８０７－２４１８５８８２７、及びｃｈｒ２：２４１８５２７０３－２４１８５２７２３から選択されるゲノム座標；または
それぞれ、ｃｈｒ２：２４１８５８７８９－２４１８５８８０９、ｃｈｒ２：２４１８５２９１９－２４１８５２９３９、ｃｈｒ２：２４１８５２９１５－２４１８５２９３５、ｃｈｒ２：２４１８５２７５５－２４１８５２７７５、ｃｈｒ２：２４１８５２７５１－２４１８５２７７１、及びｃｈｒ２：２４１８５８８０７－２４１８５８８２７から選択されるゲノム座標；または
それぞれ、ｃｈｒ２：２４１８５８７８８－２４１８５８８０８、ｃｈｒ２：２４１８５８７５５－２４１８５８７７５、ｃｈｒ２：２４１８５２７５１－２４１８５２７７１、及びｃｈｒ２：２４１８５２７０３－２４１８５２７２３から選択されるゲノム座標；または
それぞれ、ｃｈｒ２：２４１８５８７８８－２４１８５８８０８及びｃｈｒ２：２４１８

５２７０３－２４１８５２７２３から選択されるゲノム座標；または
それぞれ、ｃｈｒ２：２４１８５８７８８－２４１８５８８０８、ｃｈｒ２：２４１８５２７５１－２４１８５２７７１、ｃｈｒ２：２４１８５２７０３－２４１８５２７２３、ｃｈｒ２：２４１８５２１８８－２４１８５２２０８、及びｃｈｒ２：２４１８５２２０１－２４１８５２２２１から選択されるゲノム座標、または
それぞれ、ｃｈｒ２：２４１８５８７８８－２４１８５８８０８，ｃｈｒ２：２４１８５２７０３－２４１８５２７２３、及びｃｈｒ２：２４１８５２２０１－２４１８５２２２１から選択されるゲノム座標、または
ｃｈｒ２：２４１８５８８０７－２４１８５８８２７のゲノム座標内に、少なくとも１個のヌクレオチドの修飾を含む、実施形態２５に記載の操作された細胞である。
【表２７－１】

表１１：追加の配列

説明	配列番号	配列
CR003187	100	GACCCCCUCCACCCCGCCUCGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
G013006	101	mC*mU*mC*UCAGCUGGUACACGGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G016239	102	mG*mG*mC*CUCGGCGCUGACGAUCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G015068	90	GACGUUGAAGCCAUCUCUGUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
G015069	91	GCGGUCCCUGAGGUGCACCGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
G015070	92	GCAAUGCCAGCUGUACCAGGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
G015071	105	AGAGGAAGCUUUCCGCUAAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
G018433	106	mG*mU*mU*CCGGAACCAAUGCACAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC

【表２７－２】

		GUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G018434	107	mG*mC*mG*GUCCCUGAGGUGCACCGGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G018436	108	mA*mG*mC*AGCAGGACACAGUCAAAGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G020845	109	mA*mA*mC*CUCGUGCCCGUCUGCUGGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G021215	110	mC*mU*mG*AACUUUUCCAGAUAUACGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G021216	111	mU*mG*mA*CCAUGUGGUUAGCAUCUGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G000294	112	GACCCCCUCCACCCCGCCUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU
G000739	113	mG*mA*mU*CACGUCGGCCGUUGGCGGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G018438	114	mA*mG*mU*UGGGCAGAUAACACUUGGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
ガイド足場	200	GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
ガイド足場	201	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC
ガイド足場	202	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU U
ガイド足場	300	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmU

【表２７－３】

		mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
ガイド足場	400	GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGC
ガイド足場81	401	(N)20GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGGUGC
ガイド足場181	402	mN*mN*mN*(N)17GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAG GGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
ガイド足場94	403	(N)20GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGUGC
ガイド足場194	404	mN*mN*mN*(N)17GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC
ガイド足場95	405	(N)20GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGUGC
ガイド足場195	406	mN*mN*mN*(N)17GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC
ガイド足場871	407	(N)20GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGGUGC
ガイド足場971	408	mN*mN*mN*(N)17mGUUUfUAGmAmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCmAmAGUfUmAfAmAfAmUAmAmGmGmCmUmAG UmCmCGUfUAmUmCAmCmGmAmAmAmGmGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC
ガイド足場872	409	(N)20GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGGUGC
ガイド足場972	410	mN*mN*mN*(N)17GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAG GGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
tracrRNA	411	AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAA CUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU
組換えCas9-NLS アミノ酸配列	800	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS NEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHE KYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDL NPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK SRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDA

【表２７－４】

		KLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDIL RVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEI FFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLN REDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNRE KIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVV DKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELT KVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKED YFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEEN EDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRY TGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDD SLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVV DELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEE GIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELD INRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSE EVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAG FIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLK SKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYP KLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNF FKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSM PQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYG GFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEK NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGEL QKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAE NIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSIT GLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKV
ORFエンコードSp. Cas9	801	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAA CAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTC CCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACA CAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCGACA GCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGC AAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTAC CTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGA CAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCGAAG AAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATC GTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTA CCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCA GACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAA GTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGG ACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAG ACATACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAG

【表２７－５】

		CGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCA AGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGA GAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGCACTGAG CCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGG CAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGA CGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGT ACGCAGACCTGTTCCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCA ATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCAC AAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACG AACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGA CAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCA GAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCA AGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGA AAAGATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAAC AGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACG GAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCA ATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCCTGAAGGA CAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCC CGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTC GCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGT GGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACA GAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGACAAGAACCTGC CGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAA TACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGT CACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAA CAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAG AAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGA AGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAA GACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCT GAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAA ACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTG TTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACAT ACGCACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAG AGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGC TGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAT CCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGCAAACAGAAACT TCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAA GACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCC TGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATC AAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACT GGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTCA

10 20 30 40 50

【表２７－６】

		TCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACA GAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGA ATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGT CGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACT ACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTG GACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGT CCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGG TCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAA CGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACT GGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAA GTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGC GAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGA AACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACA GCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGAT CAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCA GCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAA ATCAACAACTACCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGC AGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGG AAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTC AGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGG CAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCT TCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAA GAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATC GTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGT CCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAG TCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAG AGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGG ACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCA TACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAG CAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAA TCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTC CTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGA TCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAAC GGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGA AGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTC CTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCC GGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGTCGAACAGCACA AGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTC AGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGT CCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAG AACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCACACTGACAAAC

【表２７－７】

		CTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAAT CGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGAC GCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAAC AAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGA AGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAG
ORFエンコード Sp. Cas9	802	ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCTGGACATCGGCACCAA CTCCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGC CCTCCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCAC TCCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCGACTCC GGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCG GCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCTGC AGGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACTCC TTCTTCCACCGGCTGGAGGAGTCCTTCCTGGTGGAGGAGGAC AAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGA CGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCACCATCTACCACC TGCGGAAGAAGCTGGTGGACTCCACCGACAAGGCCGACCTG CGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCCGG GGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACTC CGACGTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACA ACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCTCCGGCGTG GACGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTCCAAGTCCCG GCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGA AGAACGGCCTGTTCGGCAACCTGATCGCCCTGTCCCTGGGCC TGACCCCCAACTTCAAGTCCAACTTCGACCTGGCCGAGGAC GCCAAGCTGCAGCTGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCT GGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACC TGTTCCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGT CCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCC CTGTCCGCCTCCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCA GGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGC CCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAAC GGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCTCCCAGGAGGA GTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACG GCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTG CTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCTCCATCCCCCA CCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGC AGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACCGGGAGAAG ATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGC CCCCTGGCCCGGGGCAACTCCCGGTTCGCCTGGATGACCCG GAAGTCCGAGGAGACCATCACCCCCTGGAACTTCGAGGAGG TGGTGGACAAGGGCGCCTCCGCCCAGTCCTTCATCGAGCGG

【表２７－８】

		ATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCT GCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAA CGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGA AGCCCGCCTTCCTGTCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTG GACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCA GCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACT CCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCTCC CTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAA GGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGG ACATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTCGAGGACCGGGAGATG ATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCCACCTGTTCGACGA CAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACCGGCT GGGGCCGGCTGTCCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGAC AAGCAGTCCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGTCCGA CGGCTTCGCCAACCGGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACG ACTCCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCCAGGTG TCCGGCCAGGGCGACTCCCTGCACGAGCACATCGCCAACCT GGCCGGCTCCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCG TGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCCGGCAC AAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCA GACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACTCCCGGGAGCGGATG AAGCGGATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCCAGAT CCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACG AGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATG TACGTGGACCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTA CGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGTCCTTCCTGAAGGACG ACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAGAAC CGGGGCAAGTCCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAA GAAGATGAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGC TGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAG CGGGGCGGCCTGTCCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAA GCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGG CCCAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAG AACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCTGAA GTCCAAGCTGGTGTCCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTA CAAGGTGCGGGAGATCAACAACTACCACCACGCCCACGACG CCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAG TACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAA GGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGTCCGAGCAGG AGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACTCCAACA TCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCCTGGCCAACGGC

10

20

30

40

50

【表２７－９】

		GAGATCCGGAAGCGGCCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGAC CGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCG TGCGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAG AAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCTCCAAGGAGTCCAT CCTGCCCAAGCGGAACTCCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGA AGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACTCCCCC ACCGTGGCCTACTCCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAA GGGCAAGTCCAAGAAGCTGAAGTCCGTGAAGGAGCTGCTGG GCATCACCATCATGGAGCGGTCCTCCTTCGAGAAGAACCCC ATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAA GGACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACTCCCTGTTCGAGCT GGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCTCCGCCGGCGAGC TGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCTCCAAGTACGTG AACTTCCTGTACCTGGCCTCCCACTACGAGAAGCTGAAGGG CTCCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCGTGGAGC AGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCC GAGTTCTCCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGA CAAGGTGCTGTCCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCA TCCGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTCACCCTG ACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGACACC ACCATCGACCGGAAGCGGTACACCTCCACCAAGGAGGTGCT GGACGCCACCCTGATCCACCAGTCCATCACCGGCCTGTACG AGACCCGGATCGACCTGTCCCAGCTGGGCGGCGACGGCGGC GGCTCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGTGA
Hibitタグを有するCas9のオープンリーディングフレーム	803	AUGGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGACAUCGGCACCA ACUCCGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGAGUACAAGGU GCCCUCCAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACACCGACCGG CACUCCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGCGCCCUGCUGUUCG ACUCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCUGAAGCGGAC CGCCCGGCGGCGGUACACCCGGCGGAAGAACCGGAUCUGC UACCUGCAGGAGAUCUUCUCCAACGAGAUGGCCAAGGUGG ACGACUCCUUCUUCCACCGGCUGGAGGAGUCCUUCCUGGU GGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCAUCUUCGGC AACAUCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGUACCCCA CCAUCUACCACCUGCGGAAGAAGCUGGUGGACUCCACCGA CAAGGCCGACCUGCGGCUGAUCUACCUGGCCCUGGCCCAC AUGAUCAAGUUCCGGGGCCACUUCCUGAUCGAGGGCGACC UGAACCCCGACAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUCAUCCA GCUGGUGCAGACCUACAACCAGCUGUUCGAGGAGAACCCC AUCAACGCCUCCGGCGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGUCCG CCCGGCUGUCCAAGUCCCGGCGGCUGGAGAACCUGAUCGC

【表２７－１０】

		CCAGCUGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCUGUUCGGCAAC
		CUGAUCGCCCUGUCCCUGGGCCUGACCCCCAACUUCAAGUC
		CAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUGCAGCUGUCC
		AAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCCC
		AGAUCGGCGACCAGUACGCCGACCUGUUCCUGGCCGCCAA
		GAACCUGUCCGACGCCAUCCUGCUGUCCGACAUCCUGCGG
		GUGAACACCGAGAUCACCAAGGCCCCCCUGUCCGCCUCCAU
		GAUCAAGCGGUACGACGAGCACCACCAGGACCUGACCCUG
		CUGAAGGCCCUGGUGCGGCAGCAGCUGCCCGAGAAGUACA
		AGGAGAUCUUCUUCGACCAGUCCAAGAACGGCUACGCCGG
		CUACAUCGACGGCGGCGCCUCCCAGGAGGAGUUCUACAAG
		UUCAUCAAGCCCAUCCUGGAGAAGAUGGACGGCACCGAGG
		AGCUGCUGGUGAAGCUGAACCGGGAGGACCUGCUGCGGAA
		GCAGCGGACCUUCGACAACGGCUCCAUCCCCCACCAGAUCC
		ACCUGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUGCGGCGGCAGGAGGA
		CUUCUACCCCUUCCUGAAGGACAACCGGGAGAAGAUCGAG
		AAGAUCCUGACCUUCCGGAUCCCCUACUACGUGGGCCCCC
		UGGCCCGGGGCAACUCCCGGUUCGCCUGGAUGACCCGGAA
		GUCCGAGGAGACCAUCACCCCCUGGAACUUCGAGGAGGUG
		GUGGACAAGGGCGCCUCCGCCCAGUCCUUCAUCGAGCGGA
		UGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAACGAGAAGGUGCU
		GCCCAAGCACUCCCUGCUGUACGAGUACUUCACCGUGUAC
		AACGAGCUGACCAAGGUGAAGUACGUGACCGAGGGCAUGC
		GGAAGCCCGCCUUCCUGUCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCAU
		CGUGGACCUGCUGUUCAAGACCAACCGGAAGGUGACCGUG
		AAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUCAAGAAGAUCGAGUGCU
		UCGACUCCGUGGAGAUCUCCGGCGUGGAGGACCGGUUCAA
		CGCCUCCCUGGGCACCUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUC
		AAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAGGAGAACGAGGACA
		UCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACCCUGUUCGAGGA
		CCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAGACCUACGCCCAC
		CUGUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGGCGGC
		GGUACACCGGCUGGGGCCGGCUGUCCCGGAAGCUGAUCAA
		CGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGACCAUCCUGGAC
		UUCCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCAACCGGAACUUCAUGC
		AGCUGAUCCACGACGACUCCCUGACCUUCAAGGAGGACAU
		CCAGAAGGCCCAGGUGUCCGGCCAGGGCGACUCCCUGCAC
		GAGCACAUCGCCAACCUGGCCGGCUCCCCCGCCAUCAAGAA
		GGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGGACGAGCUGGUG
		AAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACAUCGUGAUCG
		AGAUGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAA

【表２７－１１】

		GAACUCCCGGGAGCGGAUGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAUC
		AAGGAGCUGGGCUCCCAGAUCCUGAAGGAGCACCCCGUGG
		AGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUACCUGUACUA
		CCUGCAGAACGGCCGGGACAUGUACGUGGACCAGGAGCUG
		GACAUCAACCGGCUGUCCGACUACGACGUGGACCACAUCG
		UGCCCCAGUCCUUCCUGAAGGACGACUCCAUCGACAACAA
		GGUGCUGACCCGGUCCGACAAGAACCGGGGCAAGUCCGAC
		AACGUGCCCUCCGAGGAGGUGGUGAAGAAGAUGAAGAACU
		ACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUCACCCAGCG
		GAAGUUCGACAACCUGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCUG
		UCCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGGCAGCUGG
		UGGAGACCCGGCAGAUCACCAAGCACGUGGCCCAGAUCCU
		GGACUCCCGGAUGAACACCAAGUACGACGAGAACGACAAG
		CUGAUCCGGGAGGUGAAGGUGAUCACCCUGAAGUCCAAGC
		UGGUGUCCGACUUCCGGAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGU
		GCGGGAGAUCAACAACUACCACCACGCCCACGACGCCUACC
		UGAACGCCGUGGUGGGCACCGCCCUGAUCAAGAAGUACCC
		CAAGCUGGAGUCCGAGUUCGUGUACGGCGACUACAAGGUG
		UACGACGUGCGGAAGAUGAUCGCCAAGUCCGAGCAGGAGA
		UCGGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCUACUCCAACAU
		CAUGAACUUCUUCAAGACCGAGAUCACCCUGGCCAACGGC
		GAGAUCCGGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACCAACGGCGAGA
		CCGGCGAGAUCGUGUGGGACAAGGGCCGGGACUUCGCCAC
		CGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUGCCCCAGGUGAACAUCGUG
		AAGAAGACCGAGGUGCAGACCGGCGGCUUCUCCAAGGAGU
		CCAUCCUGCCCAAGCGGAACUCCGACAAGCUGAUCGCCCG
		GAAGAAGGACUGGGACCCCAAGAAGUACGGCGGCUUCGAC
		UCCCCCACCGUGGCCUACUCCGUGCUGGUGGUGGCCAAGG
		UGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAGCUGAAGUCCGUGAAGGA
		GCUGCUGGGCAUCACCAUCAUGGAGCGGUCCUCCUUCGAG
		AAGAACCCCAUCGACUUCCUGGAGGCCAAGGGCUACAAGG
		AGGUGAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCCAAGUACUC
		CCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCGGAAGCGGAUGCUGGCC
		UCCGCCGGCGAGCUGCAGAAGGGCAACGAGCUGGCCCUGC
		CCUCCAAGUACGUGAACUUCCUGUACCUGGCCUCCCACUA
		CGAGAAGCUGAAGGGCUCCCCCGAGGACAACGAGCAGAAG
		CAGCUGUUCGUGGAGCAGCACAAGCACUACCUGGACGAGA
		UCAUCGAGCAGAUCUCCGAGUUCUCCAAGCGGGUGAUCCU
		GGCCGACGCCAACCUGGACAAGGUGCUGUCCGCCUACAAC
		AAGCACCGGGACAAGCCCAUCCGGGAGCAGGCCGAGAACA
		UCAUCCACCUGUUCACCCUGACCAACCUGGGCGCCCCCGCC

【表２７－１２】

		GCCUUCAAGUACUUCGACACCACCAUCGACCGGAAGCGGU ACACCUCCACCAAGGAGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCCA CCAGUCCAUCACCGGCCUGUACGAGACCCGGAUCGACCUG UCCCAGCUGGGCGGCGACGGCGGCGGCUCCCCCAAGAAGA AGCGGAAGGUGUCCGAGUCCGCCACCCCCGAGUCCGUGUC CGGCUGGCGGCUGUUCAAGAAGAUCUCCUGA
ITRを含むHD1 TCR挿入	1001	TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC GGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGC GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC AACTCCATCACTAGGGGTTCCTAGATCTTGCCAACATACCAT AAACCTCCCATTCTGCTAATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGAC CACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTT TTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGG GTTTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGCAGTAT TATTAAGTAGCCCTGCATTTCAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGC CAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGG CCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCAT CACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGC ATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGT CCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAG AGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCCTGATCCTCTTGTCCCA CAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCGGCTCCGGTGCCCGTCA GTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGG GGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGG CGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCG CCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAG TAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCA GAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGC CTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCA CGCCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGG GTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGG AGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCTTGGGCG CTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTG TCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGA TGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTA AATGCGGGCCAAGATGTGCACACTGGTATTTCGGTTTTTGGG GCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATG TTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCG GACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCT GGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAG GCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGC

10 20 30 40 50

【表２７－１３】

		CGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACG CGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAG GAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTC CACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTC GAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTT TTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTG AAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAAT TTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCA GACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGA TGCGGCCGCCACCATGGGATCTTGGACACTGTGTTGCGTGTC CCTGTGCATCCTGGTGGCCAAGCACACAGATGCCGGCGTGA TCCAGTCTCCTAGACACGAAGTGACCGAGATGGGCCAAGAA GTGACCCTGCGCTGCAAGCCTATCAGCGGCCACGATTACCTG TTCTGGTACAGACAGACCATGATGAGAGGCCTGGAACTGCT GATCTACTTCAACAACAACGTGCCCATCGACGACAGCGGCA TGCCCGAGGATAGATTCAGCGCCAAGATGCCCAACGCCAGC TTCAGCACCCTGAAGATCCAGCCTAGCGAGCCCAGAGATAG CGCCGTGTACTTCTGCGCCAGCAGAAAGACAGGCGGCTACA GCAATCAGCCCCAGCACTTTGGAGATGGCACCCGGCTGAGC ATCCTGGAAGATCTGAAGAACGTGTTCCCACCTGAGGTGGC CGTGTTCGAGCCTTCTGAGGCCGAGATCAGCCACACACAGA AAGCCACACTCGTGTGTCTGGCCACCGGCTTCTATCCCGATC ACGTGGAACTGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCAC AGCGGCGTCAGCACCGATCCTCAGCCTCTGAAAGAGCAGCC CGCTCTGAACGACAGCAGATACTGCCTGAGCAGCAGACTGA GAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCAGAAACCACTTC AGATGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGATGA GTGGACCCAGGATAGAGCCAAGCCTGTGACACAGATCGTGT CTGCCGAAGCCTGGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTTACCAGC GAGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGTCTGCCACAATCCTGTA CGAGATCCTGCTGGGCAAAGCCACTCTGTACGCCGTGCTGGT GTCTGCCCTGGTGCTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGATA GCAGGGGCGGCTCCGGTGCCACAAACTTCTCCCTGCTCAAG CAGGCCGGAGATGTGGAAGAGAACCCTGGCCCTATGGAAAC CCTGCTGAAGGTGCTGAGCGGCACACTGCTGTGGCAGCTGA CATGGGTCCGATCTCAGCAGCCTGTGCAGTCTCCTCAGGCCG TGATTCTGAGAGAAGGCGAGGACGCCGTGATCAACTGCAGC AGCTCTAAGGCCCTGTACAGCGTGCACTGGTACAGACAGAA GCACGGCGAGGCCCCTGTGTTCCTGATGATCCTGCTGAAAG GCGGCGAGCAGAAGGGCCACGAGAAGATCAGCGCCAGCTTC AACGAGAAGAAGCAGCAGTCCAGCCTGTACCTGACAGCCAG

【表２７－１４】

		CCAGCTGAGCTACAGCGGCACCTACTTTTGTGGCACCGCCTG GATCAACGACTACAAGCTGTCTTTCGGAGCCGGCACCACAG TGCTGGTACAGACAGAAGCACGGCGAGGCCCCTGTGTTCCT GATGATCCTGCTGAAAGGCGGCGAGCAGAAGGGCCACGAG AAGATCAGCGCCAGCTTCAACGAGAAGAAGCAGCAGTCCAG CCTGTACCTGACAGCCAGCCAGCTGAGCTACAGCGGCACCT ACTTTTGTGGCACCGCCTGGATCAACGACTACAAGCTGTCTT TCGGAGCCGGCACCACAGTGACTTCAAGAGCAACAGCGCCG TGGCCTGGTCCAACAAGAGCGATTTCGCCTGCGCCAACGCCT TCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCCAAGTC CTGAGAGCAGCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTC GAGACAGACACCAACCTGAACTTCCAGAACCTGAGCGTGAT CGGCTTCAGAATCCTGCTGCTCAAGGTGGCCGGCTTCAACCT GCTGATGACCCTGAGACTGTGGTCCAGCTAACCTCGACTGTG CCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGC CTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCT AATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGT CATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGG GGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCG GTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGG CTCTAGGGGGTATCCCCACTAGTCGTGTACCAGCTGAGAGA CTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTT TGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGT GTATATCACAGACAAAACTGTGCTAGACATGAGGTCTATGG ACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCT GACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCA GAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGT GCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTC TGCCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAACTCCTCTGATT GGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAAACCCTCTTTTT ACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATG ACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAG GGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTAGATCTAGGAACCCCTA GTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTC ACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTT TGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGG GAGTGGCCAA

10

20

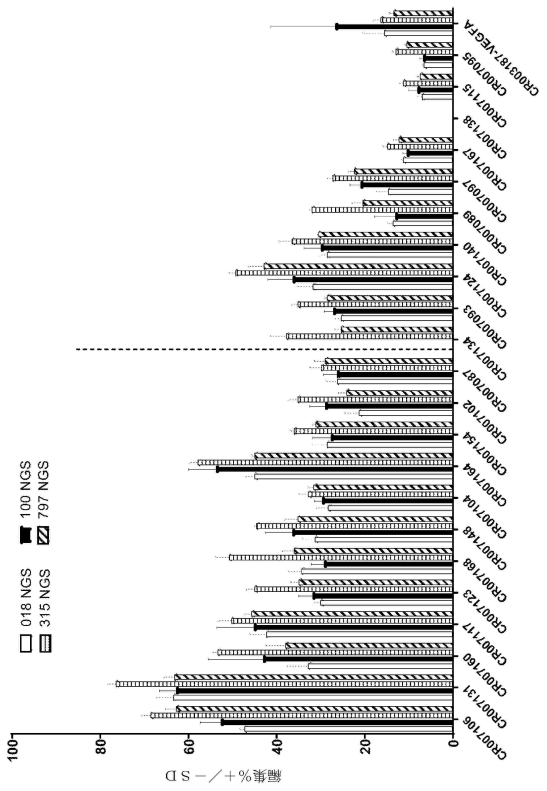
30

40

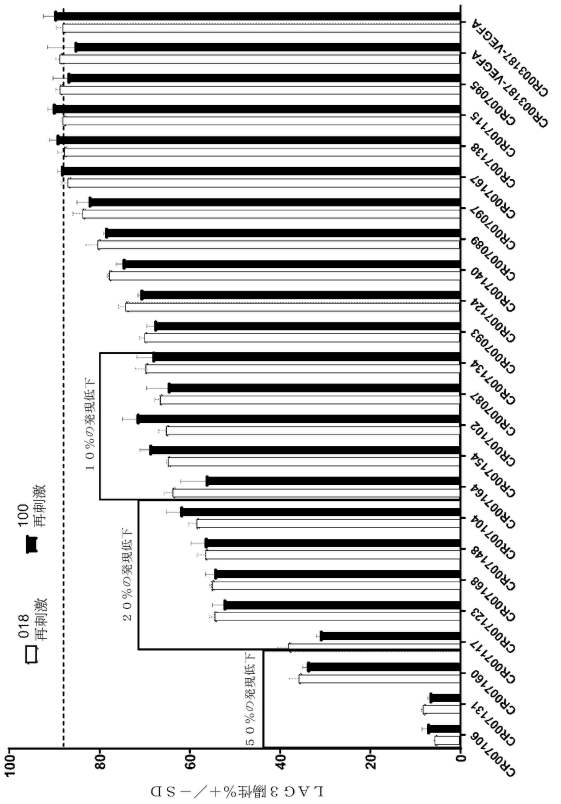
50

【図面】

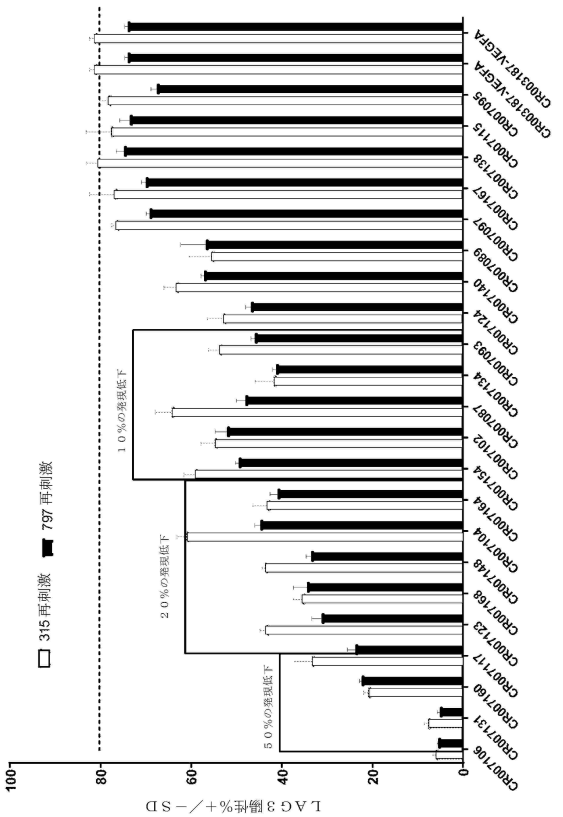
【図１】



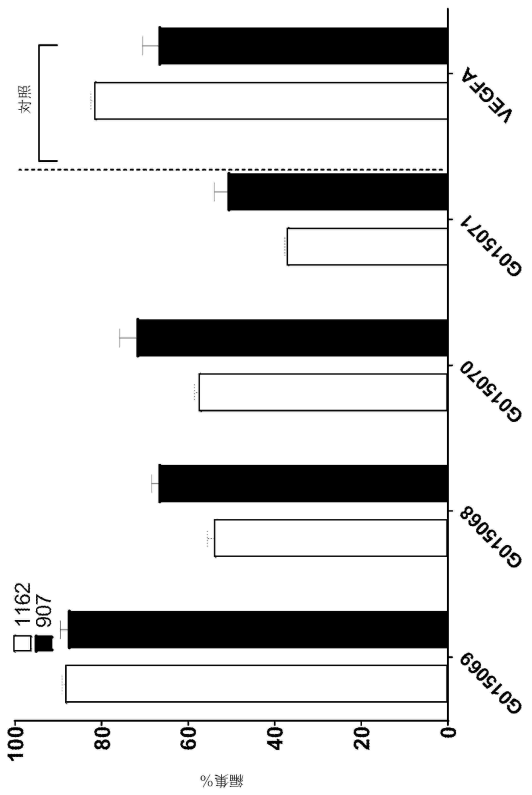
【図２Ａ】



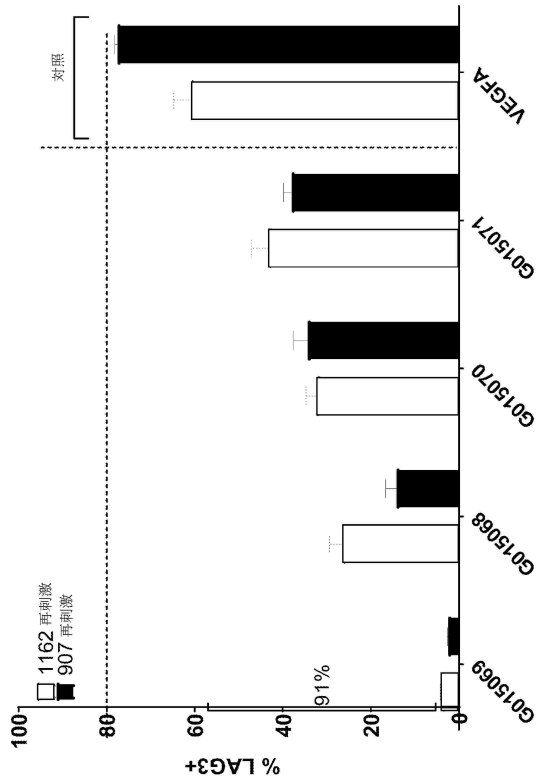
【図２Ｂ】



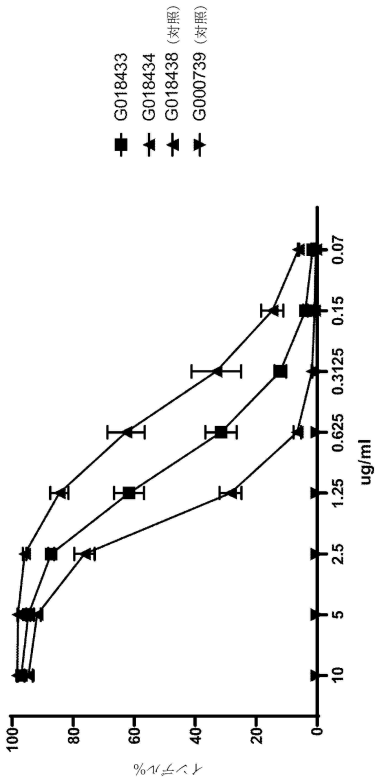
【図３Ａ】



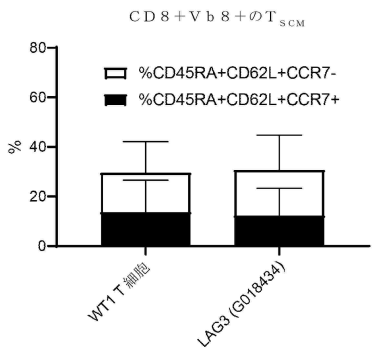
【図３Ｂ】



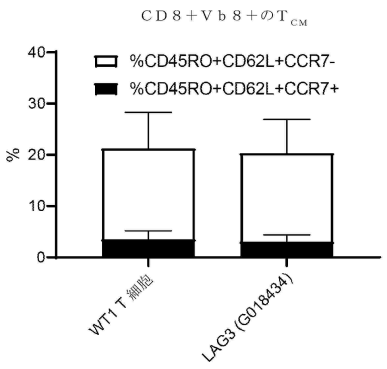
【図４】



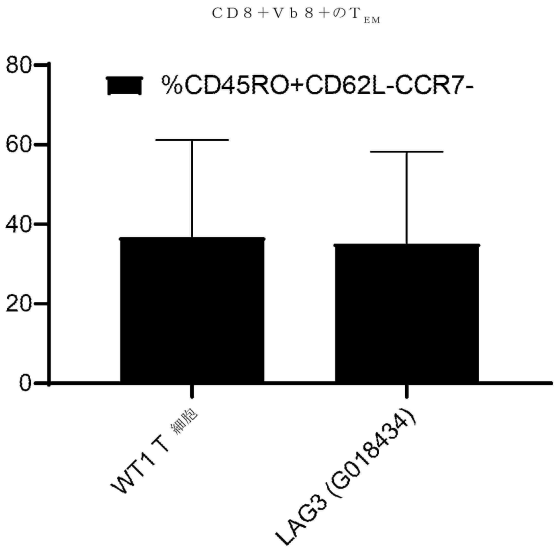
【図５Ａ】



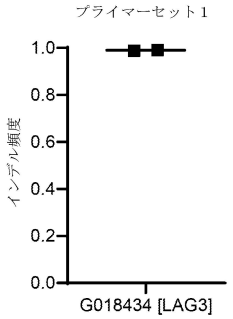
【図５Ｂ】



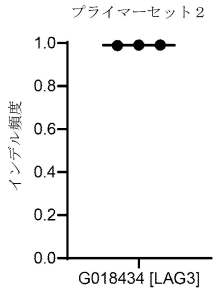
【図５Ｃ】



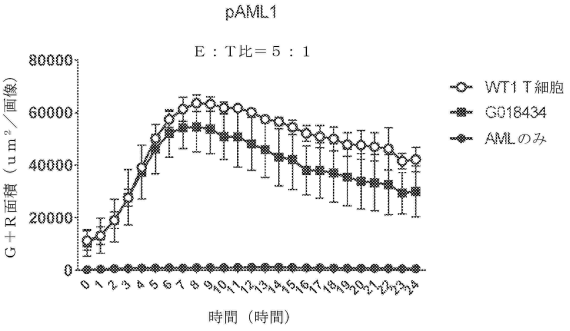
【図６Ａ】



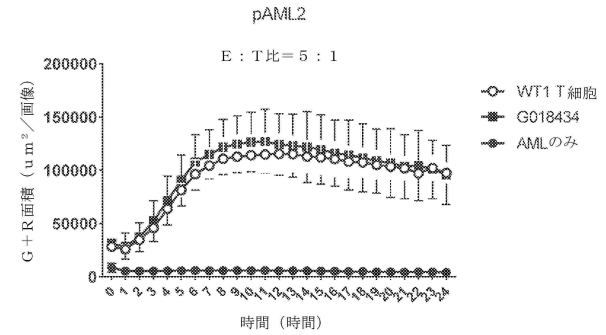
【図６Ｂ】



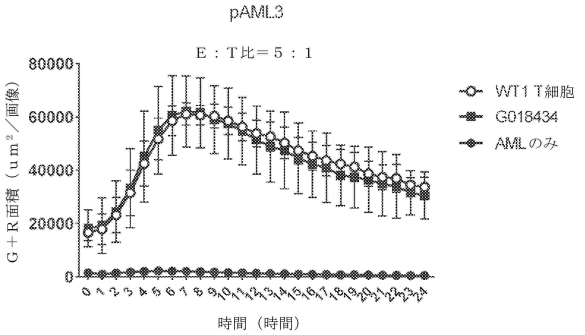
【図７Ａ】



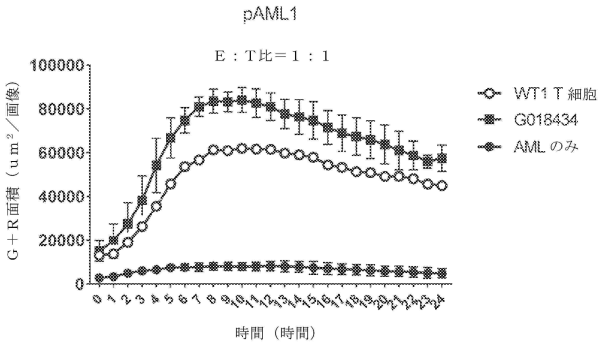
【図７Ｂ】



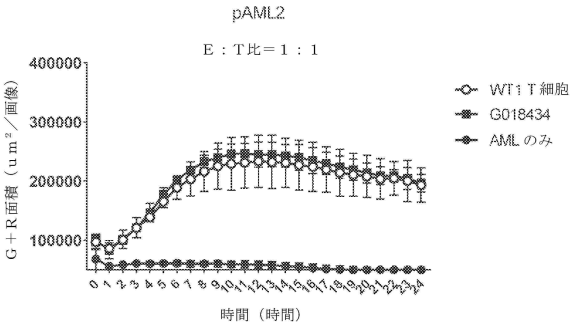
【図７Ｃ】



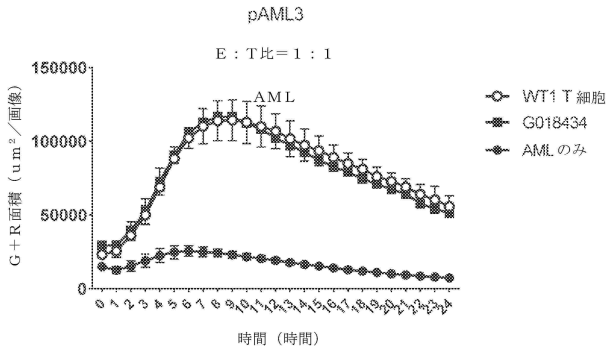
【図７Ｄ】



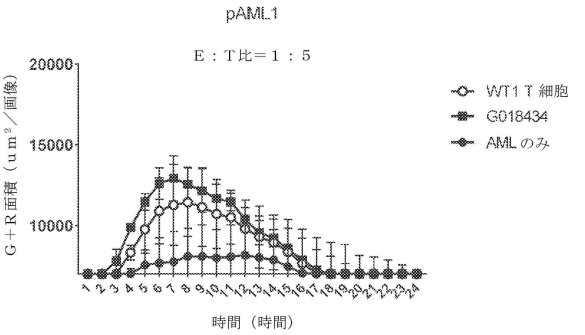
【図７Ｅ】



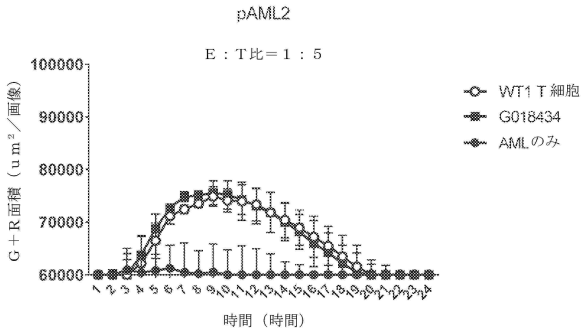
【図７Ｆ】



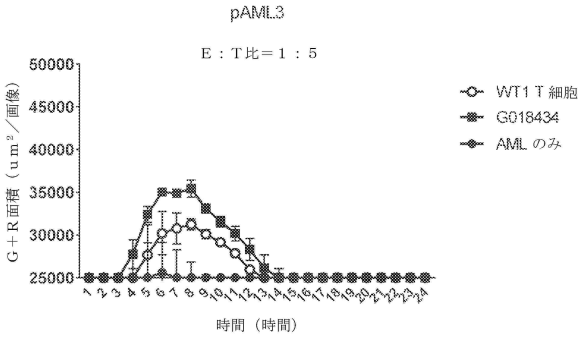
【図７Ｇ】



【図７Ｈ】



【図７Ｉ】



【配列表】

<u>２０２４５０５６７８０００００１.ａｐｐ</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/015498

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/00 A61P35/00 C07K14/725 C12N5/0783 C12N15/113
C12N15/90
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K A61P C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHANG YONGPING ET AL: "CRISPR-Cas9 mediatedLAG-3disruption in CAR-T cells", FRONTIERS OF MEDICINE, HIGHER EDUCATION PRESS, HEIDELBERG, vol. 11, no. 4, 17 June 2017 (2017-06-17), pages 554-562, XP036378721, ISSN: 2095-0217, DOI: 10.1007/S11684-017-0543-6 [retrieved on 2017-06-17] the whole document -----	1-52
A	CN 108 531 457 A (HANGZHOU RONGZE BIOTECHNOLOGY CO LTD) 14 September 2018 (2018-09-14) the whole document -----	1-52
	-/--	

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
3 June 2022	05/08/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Manu, Dominique

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/015498

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/015498

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:

1-52 (partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/015498

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 107 746 845 A (BEIJING WEIXUAN GENE TECH CO LTD) 2 March 2018 (2018-03-02) the whole document	1-52
X	WO 2016/183345 A1 (SEATTLE CHILDREN' S HOSPITAL [US]) 17 November 2016 (2016-11-17)	1-5,7, 13, 16-21, 25-40, 42-52
Y	the whole document	6,8-12, 14,15, 24,41
X	US 2020/181610 A1 (BENSON MICAH [US] ET AL) 11 June 2020 (2020-06-11) the whole document	1-4,18, 20, 24-40, 42,44-49
Y	HONG MIHE ET AL: "Engineering CAR-T Cells for Next-Generation Cancer Therapy", CANCER CELL, CELL PRESS, US, vol. 38, no. 4, 30 July 2020 (2020-07-30), pages 473-488, XP086291382, ISSN: 1535-6108, DOI: 10.1016/J.CCELL.2020.07.005 [retrieved on 2020-07-30] the whole document	6,8-10, 24
Y	WO 2016/183041 A2 (HARVARD COLLEGE [US]) 17 November 2016 (2016-11-17) the whole document	11,12, 14,15,24
Y	WO 2017/173054 A1 (INTELLIA THERAPEUTICS INC [US]) 5 October 2017 (2017-10-05) cited in the application the whole document	41

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/015498

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CN 108531457 A	14-09-2018	NONE	
CN 107746845 A	02-03-2018	NONE	
WO 2016183345 A1	17-11-2016	AU 2016262093 A1	30-11-2017
		CA 2985650 A1	17-11-2016
		CN 108136047 A	08-06-2018
		EP 3294343 A1	21-03-2018
		HK 1252144 A1	17-05-2019
		JP 2018520648 A	02-08-2018
		US 2016333377 A1	17-11-2016
		US 2018119174 A1	03-05-2018
		US 2020377911 A1	03-12-2020
		WO 2016183345 A1	17-11-2016
US 2020181610 A1	11-06-2020	BR 112020018658 A2	29-12-2020
		EP 3765094 A1	20-01-2021
		US 2019284553 A1	19-09-2019
		US 2020181610 A1	11-06-2020
		US 2021388349 A1	16-12-2021
WO 2016183041 A2	17-11-2016	AU 2016261600 A1	04-01-2018
		AU 2021221859 A1	30-09-2021
		CA 2988854 A1	17-11-2016
		CN 107921148 A	17-04-2018
		EP 3294342 A2	21-03-2018
		HK 1254190 A1	12-07-2019
		JP 2018515139 A	14-06-2018
		JP 2022090109 A	16-06-2022
		US 2019309259 A1	10-10-2019
		US 2021261916 A1	26-08-2021
		US 2022112459 A1	14-04-2022
		WO 2016183041 A2	17-11-2016
WO 2017173054 A1	05-10-2017	AU 2017244143 A1	11-10-2018
		BR 112018069795 A2	29-01-2019
		CA 3018978 A1	05-10-2017
		CN 109475646 A	15-03-2019
		CO 2018011554 A2	08-02-2019
		EP 3436077 A1	06-02-2019
		JP 2019516351 A	20-06-2019
		KR 20190002493 A	08-01-2019
		TW 201802242 A	16-01-2018
		US 2019136231 A1	09-05-2019
		WO 2017173054 A1	05-10-2017

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

International Application No. PCT/US2022/015498

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-52(partially)

An engineered cell comprising a genetic modification in a human LAG3 sequence, within genomic coordinates of LAG3-1: chr12:6773938-6773958. A pharmaceutical composition comprising said cells. A population of cells comprising said cells. A method of treating a subject with said cells. The cells, the population of cells or the pharmaceutical composition for use in ACT. A LAG3 guide RNA that specifically hybridizes to a LAG3 sequence comprising the nucleotide sequence with SEQ ID NOs 1. A LAG3 guide RNA comprising a guide sequence that directs an RNA-guided DNA binding agent to a chromosomal location within the genomic coordinates targeted by SEQ ID NO: 1. A composition comprising said guide RNA. A method of making a genetic modification in the LAG3 sequence and a method of preparing cells for immunotherapy with said guide RNA. The population of cells made by said methods. A method of treating a subject with said population. The population for use in ACT. A population of cells comprising a genetic modification of a LAG3 gene, wherein at least 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, preferably at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of cells in the population comprise a modification selected from an insertion, a deletion, and a substitution in the endogenous LAG3 sequence

---

2-22. claims: 1-52(partially)

Same as Group I for the genomic coordinates LAG3-2 (chr12:6774678-6774698), LAG3-3 (chr12:6772894-6772914), LAG3-4 (chr12:6774816-6774836), LAG3-5 (chr12:6774742-6774762), LAG3-6 (chr12:6775380-6775400), LAG3-7 (chr12:6774727-6774747), LAG3-8 (chr12:6774732-6774752), LAG3-9 (chr12:6777435-6777455), LAG3-10 (chr12:6774771-6774791), LAG3-11 (chr12:6772909-6772929), LAG3-12 (chr12:6774735-6774755), LAG3-13 (chr12:6773783-6773803), LAG3-14 (chr12:6775292-6775312), LAG3-15 (chr12:6777433-6777453), LAG3-16 (chr12:6778268-6778288), LAG3-17 (chr12:6775444-6775464), LAG3-24 (chr12:6777783-6777803), LAG3-26 (chr12:6777784-6777804), LAG3-41 (chr12:6778252-6778272), LAG3-59 (chr12:6777325-6777345), and LAG3-83 (chr12:6777329-6777349) and for the guide RNAs comprising the sequence with SEQ ID NOs: 2-17, 24, 26, 41, 59 and 83 respectively

---

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*37/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/04		
Ａ６１Ｐ	*31/20*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/20		
Ａ６１Ｐ	*31/14*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/14		
Ａ６１Ｐ	*31/18*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/18		
Ａ６１Ｋ	*35/17*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/17		
Ａ６１Ｐ	*31/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/06		
Ａ６１Ｐ	*33/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	33/06		
Ａ６１Ｐ	*43/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１２１	
Ａ６１Ｋ	*48/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		
Ａ６１Ｐ	*1/16*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/16		
Ａ６１Ｋ	*9/14*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/14		
Ｃ１２Ｎ	*15/09*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/09	１１０	
Ａ６１Ｋ	*47/68*	*(2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/68		
Ａ６１Ｋ	*39/395*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395		Ｅ
Ａ６１Ｋ	*38/47*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395		Ｔ
			Ａ６１Ｋ	38/47		

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９，ケンブリッジ，エリー ストリート ４０，インテリア セラピューティクス，インコーポレイテッド内

Ｆターム（参考）
4B065 AA90X AA90Y AA94X AA94Y AB01 CA24 CA44
4C076 AA30 AA95 CC07 CC16 CC27 CC31 CC34 CC35 CC41 EE59
4C084 AA02 AA03 AA13 BA42 BA44 CA53 DC22 MA43 NA05 NA13 ZA751 ZB021 ZB091 ZB261 ZB331 ZB351 ZB381 ZC551
4C085 AA13 AA14 BB01 BB12 BB50 CC03 CC31
4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 CA04 MA43 NA05 NA13 ZA75 ZB02 ZB09 ZB26 ZB33 ZB35 ZB38 ZC55 ZC75